

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)

Année : 2016

N° d'ordre : 177

**DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET SES
IMPLICATIONS SUR LE DIAGNOSTIC ET LE
MONITORING DU VIH-1 ET DU VHC**

THESE DE DOCTORAT ès SCIENCES

SPECIALITE : GENETIQUE DES POPULATIONS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Le 08 Janvier 2016

Par

OUSSEYNOU NDIAYE

MEMBRES DU JURY

Président :	Moussa Seydi	Professeur	FMPOS
Rapporteurs :	Babacar Faye	Professeur	UGB
	Papa Madiaye Gueye	Maître de conférences agrégé	FMPOS
	Makhtar Camara	Maître de conférences agrégé	FMPOS
Examineur :	Ngor Faye	Professeur	FST
Directrices :	Halimatou Diop Ndiaye	Maître de conférences agrégé	FMPOS
	Coumba Touré-Kane	Professeur	FMPOS

**DÉDICACES
ET
REMERCIEMENTS**

Au nom d'Allah le tout miséricordieux le très miséricordieux...

...Paix et Salut sur son prophète Mohamed...

Ce travail est dédié

- ✓ A mon cher père pour l'effort et l'éducation qu'il nous a donné et qu'il trouve dans ce travail les fruits mérités de tous tes sacrifices.
- ✓ A mes chères Ndéye Coumba : D'abord Ndéye Coumba Traoré ma maman pour nous avoir donné la vie et je prie tous les jours pour pouvoir vous honorer. Ensuite Ndéye Coumba Touré Kane mon cher maître pour la formation et son rôle de seconde mère. Enfin Ndéye Coumba Ndir Ndiaye, ma chère femme pour son soutien permanent et qui m'a fait également le plaisir d'être Père.
- ✓ A mes parents, frères, sœurs, belles sœurs bref à toute la famille et mes proches.
- ✓ A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie Virologie avec une mention spéciale pour l'unité de biologie moléculaire
- ✓ Au personnel du Centre Régional de Recherche et de Formation CRCF/Fann

A NOS MAÎTRES ET JUGES

Professeur Moussa Seydi,

Professeur titulaire et chef de service aux Maladies Infectieuses et formateur sur la prise en charge médicale de l'infection à VIH et des hépatites virales, je suis honoré de vous avoir comme président de jury. Votre simplicité et votre gentillesse inspire l'admiration et votre compétence se fait distinguer aussi bien au niveau professionnel qu'universitaire. Veuillez trouver ici cher Maître, le témoignage de notre profonde gratitude.

Professeur Coumba Touré-Kane,

Chercheur de renommé international, vous incarnez le leadership féminin africain dans le domaine de la recherche scientifique. Votre courage et votre détermination vous poussent à ne ménager aucun effort pour la bonne marche de notre structure. Vos qualités humaines exceptionnelles ont permis de créer une atmosphère propice à l'épanouissement de la jeune génération de scientifiques africains. Soyez assurée de mon engagement et ma dévotion et que le tout Puissant vous accorde une très bonne santé et qu'Il vous permette de réaliser vos ambitieux projets.

Professeur Babacar Faye,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de critiquer notre travail de thèse. Votre gentillesse et votre désir permanent à soutenir et à former les jeunes chercheurs, font de vous une personne admirable et admirée par toutes les générations que vous avez eu à former.

Professeur Papa Madiaye Gueye

Cher Professeur, merci de nous avoir honoré en acceptant avec spontanéité, de participer à ce jury de thèse malgré votre agenda chargé. Vos qualités humaines, sont reconnues et appréciées de tous et soyez assuré de notre profonde reconnaissance,

Professeur Makhtar Camara

Merci Professeur, pour la spontanéité par laquelle vous avez également accepté de siéger dans ce jury de thèse avec un délai ci court. Votre simplicité et votre rigueur

dans le travail inspire le respect de tous et trouvez par ce travail notre profonde gratitude.

Professeur Ngor FAYE,

Cher professeur, c'est un énorme plaisir pour nous de vous avoir comme juge pour ce travail. D'abord vous avez été un enseignant respectable et respecté durant notre formation sur les bases de la biologie. Vous aviez présidé le jury lors de la soutenance de mon mémoire de master et aujourd'hui vous nous faites encore l'honneur en participant à ce jury de thèse de doctorat. La disponibilité et la sensibilité aux préoccupations d'autrui font les grands hommes dont vous faites parti.

Professeur Halimatou Diop Ndiaye

Nous sommes très sensibles et honorés de vous avoir comme membre du Jury. Formatrice, vous avez accepté de guider nos premiers pas dans le monde de la recherche. Votre gentillesse et votre désir permanent de partager votre connaissance à marquer plus d'un chercheur. Vous êtes un vrai model pour nous, tant sur le plan comportemental que professionnel. Je pense que les mots ne suffisent pas pour vous témoigner toute ma gratitude.

**LISTE
DES
ABBREVIATIONS**

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide Aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADRP	Adipocyte Differentiation-Related Protein
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et des hépatites virales
ARFP	Alternative Reading Frame Protein
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARN _{t3} ^{Lys}	ARN de transfert de la lysine
ART	Antiretroviral Therapy
ARV	Antirétroviral
AZT	Zidovudine
CA	Capside
CD	Cellule Dendritique
CCR5	CC chemokine Receptor type 5 (Récepteur de chimiokines 5)
CD4	Cluster of differentiation 4 (Protéine de différentiation 4)
CD8	Cluster of differentiation 8 (Protéine de différentiation 8)
CDC	Center for Disease Control (and prevention)
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CLDN	Claudine
CLIP	Coupled Amplification and sequencing step
CK II	Caséine kinase II
CNLS	Conseil National de Lutte contre le SIDA
CMH	Complexe majeur d'Histocompatibilité
CRF	Circulating Recombinant Form
CV	Charge Virale
CoV	Coefficient de variation
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4 (récepteur de chimiokines 4)
DBS	Dried Blood Spot
DCI	Dénomination Commune Internationale
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-Integrin
DC-SIGNR	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-Integrin Related
dNTP	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EIA	Enzyme linked ImmunoAssay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
env	Enveloppe
FAS	Fatty Acid Synthase
FDA	Food and Drug Administration

<i>gag</i>	group-specific antigen
gp	Glycoprotéine
HAART	Highly Astive Antiretroviral Therapy
HALD	Hôpital Aristide Le Dantec
HCC	HépatoCarcinome Cellulaire
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HL	Hepatic Lipase
HR1/HR2	Heptad Repeat Region 1/2
HSH	Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic Virus 1</i>
HVR	Hyper Variable Region
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IDL	Intermediar Density Lipoprotein
IFN	Interféron
IN	Intégrase
INNTI	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INTI	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP	Inhibiteurs de Protéase
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISAARV	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
IST	Infection Sexuellement Transmissible
LAV	<i>Lymphadenopathy Associated Virus,</i>
LBV	Laboratoire de Bactériologie-Virologie
LD	Lipid Droplets
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotéine Lipase
LPV/r	lopinavir/ritonavir
LT CD4	Lymphocyte T CD4
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MHA	Multi-region Hybridization Assay
MSM	Men who have Sex with Men
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
NANBH	Hépatites non A non B
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NC	Nucléocapside
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
<i>nef</i>	negative expression factor
NES	Nuclear Export Sequence
NK	Natural Killer
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
NSE	Signal d'Exportation Nucléaire

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
ORF	Open Reading Frames
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Primer Binding Site
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Pre-integration complexe
PNLH	Programme National de Lutte contre les Hépatites
<i>pol</i>	Polymerase
<i>Pr</i>	Protéase
PS	Professionnelles du sexe
Pr160Gag-Pol	Polyprotéine Gag –Pol
Pr55 ^{Gag}	Polyprotéine Gag
PTB	Polypyrimidine Tract Binding protein
RAP	Receptor Associated Protein
RARS	Réseau Africain de Recherche sur le SIDA
RDC	République Démocratique du Congo
RE	Reticulum Endoplasmique
<i>rev</i>	regulator of expression virus
RIBA	Recombinant ImmunoBlot Assay
RNase H	Ribonucléase H, enzyme de dégradation de l'ARN
RRE	Rev Responsive Element
RT	Reverse Transcription
RTC	Reverse Transcription Complexe
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RVS	Réponse Virologique Soutenue
SGA	Single Genom Amplification
SGS	Single Genom Sequencing
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SIVcpz	Simian Immunodeficiency Virus infecting chim-panzees
SIVsm	Simian Immunodeficiency Virus from sooty mangabeys
SIVrcm	Simian Immunodeficiency Virus from red-capped mangabeys
SIVgor	Simian Immunodeficiency Virus from gorilla
SP	Signal Peptidase
SPP	Signal Peptide Peptidase
SR-B1	Scavenger Receptor Classe B Type 1
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
SU	Surface
TAR	Trans-Activation Responsive region
TARV	Traitement Antirétroviral
<i>tat</i>	trans-activator of transcription
TDF	Tenofovir
TI	Transcriptase Inverse

TM	Transmembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
UNAIDS	United Nations Programme on HIV/AIDS
UNG	Uracil DNA Glycosylase
URF	Unique Recombinant Form
USA	United States of America
VAP-A	Vesicle-associated membrane Protein-associated protein A
<i>vif</i>	virion infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2
VIS	Virus d'Immunodéficience Simien
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
<i>vpr</i>	viral protein R
<i>vpu</i>	viral protein U
<i>vpx</i>	viral protein X
WHO	World Health Organization

**LISTE
DES
ACIDES AMINES**

LISTE DES ACIDES AMINES

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
O	Pyl	Pyrrolysine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
U	Sec	Sélénocystéine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

**LISTE
DES
FIGURES**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La particule virale du VIH-1	6
Figure 2 : Organisation du génome du virus VIH et expression des gènes	9
Figure 3 : Organisation du gène gag et production des particules virales	11
Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1	12
Figure 5 : Schéma de la transcriptase inverse (dans un complexe avec un acide nucléique) avec ces deux sous unités (p66 et p51) et leurs sous domaines	13
Figure 6 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH.....	14
Figure 7 : Représentation schématique du précurseur gp160.....	15
Figure 8 : Modèle de capture du VIH par les cellules DC-SIGN	19
Figure 9 : différentes phases de l'entrée du VIH dans la cellule hôte.....	20
Figure 10 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral.....	21
Figure 11 : Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réplication du virus	22
Figure 12 : Cycle de réplication du VIH-1	24
Figure 13 : Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1.	30
Figure 14 : structure du VHC	45
Figure 15 : Génome du virus de l'hépatite C	46
Figure 16 : Vue d'ensemble de cycle de réplication du VHC	55
Figure 17 : Répartition géographique des sous types et formes recombinantes	65

**TABLES
DES
MATIERES**

Table des matières

INTRODUCTION	1
1 ^{er} partie: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
Chapitre 1 : Généralité sur le VIH.....	4
1. Histoire de l'infection à VIH.....	4
1.1. Classification	4
1.2. Origine du VIH.....	4
1.3. Découverte du VIH.....	5
2. Biologie du VIH.....	6
2.1. Structure et organisation génomique.....	6
2.1.1. Structure du VIH	6
2.1.2. Organisation génomique du VIH.....	8
2.1.2.1. Les LTR	9
2.1.2.2. Les gènes de structure.....	10
2.1.2.2.1. Le gène <i>gag</i>	10
2.1.2.2.2. Le gène <i>pol</i>	11
2.1.2.2.3. Le Gène <i>env</i>	14
2.1.2.2.4. Les gènes accessoires.....	15
2.1.2.2.4.1. Les gènes de régulation.....	15
2.1.2.2.4.2. Les gènes auxiliaires.....	16
2.2. Réplication virale et évolution de l'infection.....	18
2.2.1. Tropisme.....	18
2.2.2. Réplication virale du VIH	18
2.2.2.1. Phase précoce :	18
2.2.2.2. Phase tardive :	23
3. Diversité génétique du VIH	25
3.1. Origine de la variabilité génétique	25
3.1.1. Les mutations aléatoires fréquentes.....	25
3.1.2. Les pressions de sélection	25
3.1.3. Les recombinaisons génétiques	26
3.2. Les différents groupes, sous types et formes recombinants	26
3.2.1. Les différents groupes du VIH-1	27
3.2.2. Les différents sous-types et formes recombinantes du groupe M	27
3.3. Répartition des sous types et formes recombinantes dans le monde	29

3.4.	Impact de la diversité génétique sur le diagnostic et le monitoring	30
3.4.1.	Impact de la diversité génétique sur le diagnostic	30
3.4.2.	Impact de la diversité sur le monitoring virologique	31
3.4.3.	Impact de la diversité génétique sur le traitement :	31
3.4.4.	Impact de la diversité génétique sur la recherche vaccinale :	32
4.	Les outils de diagnostic et de monitoring biologique du VIH.....	32
4.1.	Les techniques de diagnostic de l'infection à VIH/SIDA.....	33
4.1.1.	Les techniques moléculaires de diagnostic	33
4.2.	Les outils de monitoring biologique du VIH	34
4.2.1.	Les techniques de suivi virologique	34
4.2.2.	Implantation et décentralisation des plateformes de charge virale	35
4.3.	L'étude de la diversité génétique.....	40
Chapitre 2 : Généralité sur le VHC		44
1.	Histoire de l'infection à VHC	44
1.1.	Découverte du Virus de l'Hépatite C (VHC)	44
1.2.	Classification du VHC.....	44
2.	Biologie du VHC	45
2.1.	Structure et organisation génomique.....	45
2.1.1.	Structure du VHC.....	45
2.1.2.	Le génome du VHC	45
2.1.2.1.	Régions non codantes.....	46
2.1.2.2.	Les protéines virales	47
2.2.	Réplication virale et évolution de l'infection.....	54
3.	Diversité génétique du VHC.....	59
3.1.	Origine de la variabilité génétique	59
3.2.	Les différents génotypes, sous types et formes recombinants.....	60
3.2.1.	La variabilité inter-individus	60
3.2.2.	La variabilité intra-individus	61
3.2.3.	Les formes recombinantes	62
3.3.	Répartition des sous types et formes recombinantes dans le monde	64
3.4.	Impact de la diversité génétique sur le traitement	65
4.	Les outils de diagnostic et de monitoring biologique du VHC	67
4.1.	Les techniques de diagnostic	67
4.2.	Les techniques de suivi virologique.....	67

4.3. Les techniques de typage génomique.....	68
2 ^{ème} Partie.....	70
CHAPITRE 3 : METHODOLOGIE	70
1. Contexte	70
1.1. Informations générales sur le Sénégal	70
1.2. Situation sanitaire.....	70
1.3. Situation épidémiologique du VIH/SIDA.....	71
1.4. Situation épidémiologique du VHC.....	71
2. Justificatifs de la thèse.....	73
3. Cadre de l'étude	74
4. Méthodologie utilisée	75
CHAPITRE 3 : RESULTATS	90
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	90
CONCLUSION GENERALE :.....	98
LES PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS :.....	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	102
ANNEXES	149

INTRODUCTION

Introduction

Le Virus de l'Immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus infectant l'homme et le conduisant à plus ou moins long terme au Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Les premiers cas ont été décrits pour la première fois au cours des années 80 aux USA par le Centre of Diseases Control (CDC) après une recrudescence des cas de pneumonies et de sarcomes de Kaposi.

Le VIH est un virus à ARN (acide ribonucléique) appartenant à la famille des *Retroviridae* qui est caractérisée par une étape de rétro transcription du génome en ADN (acide désoxyribonucléique) qui va s'intégrer au génome de l'hôte. Le génome viral est caractérisé par deux brins ARN associé à une enzyme de transcription inverse (la retro-transcriptase). Le génome comprend 3 gènes principaux codant pour les protéines de structures et les enzymes virales et 6 gènes accessoires intervenant dans la régulation du cycle de réplication.

Les mutations aléatoires, la pression de sélection et le phénomène de recombinaison génétique sont à l'origine de la grande diversité génétique du VIH. Il existe deux types de virus, le VIH-1 (**Barre-Sinoussi et al., 1983; 2004**) et le VIH-2 (**Barin et al., 1985**) avec seulement 30% d'homologie. Mais c'est le VIH-1 qui est largement majoritaire dans le monde et peut être classé en différents groupes : M, N, O et récemment le groupe P par Plantier et al., 2009. Le groupe M (Main ou Major) est majoritaire et représenté par des sous types et des formes recombinantes circulantes ou CRF (pour Circulating Recombinant Forms).

La pandémie est ainsi caractérisée par la circulation de plusieurs sous-types génétiques et une quantité extrêmement importante de recombinants inter-sous-types. Cette grande diversité génétique ne cesse d'augmenter avec des doubles infections entre les sous types du VIH mais également des co-infections entre le VIH et les Virus de Hépatite B (VHB) et Virus de Hépatite C (VHC).

Tout comme le VIH, le VHC est un virus à ARN appartenant à la famille des *Flaviviridae* qui est caractérisée une étape de transcription du génome en ARN- qui à son tour est traduit en plusieurs brins ARN+ mais ne présente pas d'étape d'intégration. Le génome du VHC est caractérisé par un simple brin ARN de polarité positif. Il code pour une polyprotéine de 10 protéines dont des protéines de structures (core, E1 et E2) des protéines de réplication, d'assemblage et de maturation (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Le VHC est également

caractérisé par une grande diversité génétique avec six génotypes différents subdivisés en plus de 70 sous-types. Cette variabilité génétique du VHC est impliquée dans la réponse au traitement. Elle est aussi l'un des principaux freins à la mise au point d'un vaccin.

Le monitoring de cette grande diversité génétique est donc nécessaire pour assurer un diagnostic et un suivi optimal des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et/ou VHC. Le diagnostic est essentiellement basé sur des tests sérologiques mais pour les enfants nés de mères séropositives, c'est le diagnostic moléculaire qui est effectué du fait de la persistance des anticorps maternels. Le suivi des PVVIH se fait par la détermination du taux de CD4 qui permet l'initiation du traitement antirétroviral lorsque le taux de CD4 est inférieur à 500 cellules/mm³ de sang (WHO, 2013). Avec les dernières recommandations de l'OMS (WHO, 2015), une recommandation forte de l'OMS est de traiter les patients adultes quel que soit leur taux de CD4. L'évaluation de l'efficacité du traitement antirétroviral se fait par la quantification de la charge virale plasmatique grâce à des plateformes de biologie moléculaires.

Diverses techniques de quantification de la charge virale plasmatiques sont maintenant disponibles et sont basées sur des principes différents (**Braun et al., 2007**). Mais toutes ces techniques dépendent d'une séquence génétique cible qui est soumise à la grande variabilité génétique des sous types et des formes recombinantes circulantes du VIH (**Hemelaar et al., 2006**). Ainsi des études ont montré que certains groupes, tels que le groupe O, ne sont pas amplifiés par certains kits de charge virale (**Swanson et al., 2005**), mais également que certains sous type sont sous quantifiés selon la technologie de charge virale utilisée (**Wang et al., 2008**). Toutefois, l'utilisation de la charge virale est devenue une recommandation forte de l'OMS pour le suivi des patients sous Antirétroviraux (ARV) depuis 2013 et le nombre de molécules disponibles dans les pays en voie de développement pour le traitement des patients sous ARV est très limité d'où la nécessité d'un management efficace des outils virologiques pour la prévention d'émergence de mutations de résistance.

Il est donc important de maîtriser la grande diversité génétique et leur impact sur les outils de diagnostic et de monitoring pour leur assurer un suivi optimal.

C'est ainsi que nous nous sommes fixé comme objectif général de décrire la diversité génétique du VIH-1 et du VHC et de comparer les techniques moléculaires de diagnostic et de monitoring du VIH-1

Et pour atteindre cet objectif que nous avons entrepris, nous avons subdivisé ces travaux de thèse en quatre objectifs spécifiques de recherche qui sont :

Objectif 1 : Décrire la diversité génétique et les phénomènes de doubles infections du VIH-1 dans le groupe spécifique des hommes qui ont des rapports sexuels avec les hommes

Objectif 2 : Décrire la diversité génétique du VHC par une étude pilote, une première du genre dans le groupe des usagers de drogue avec le papier buvard comme support de prélèvement dans le contexte de pays à ressources limitées.

Objectif 3 : D'évaluer les performances de NucliSens EasyQ v2.0® (Biomérieux) par rapport à la technique d'Amplicor HIV-1 DNA test®, v1.5 des laboratoires de Roche qui est la technique de référence pour le diagnostic moléculaire.

Objectif 4 : Comparer quatre techniques commerciales de charge virale dans une zone de circulation des sous-types non B

Pour mener à bien ce travail, le présent document s'articulera sur 2 grandes parties et en 5 chapitres :

1^{ère} Partie : Revue de la littérature

- ✓ Chapitre 1 : La généralité sur le VIH
- ✓ Chapitre 2 : La généralité sur le VHC

2^{ème} Partie : Travaux de recherche

- ✓ Chapitre 1 : Description des méthodologies utilisées dans les différents travaux.
- ✓ Chapitre 2 : Présentations des résultats
- ✓ Chapitre 3 : Discussions avec la littérature des différents travaux

Une conclusion générale sera dégagée pour faire la synthèse des différents travaux et leurs perspectives

1^{ÈRE} PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉ SUR LE VIH

1^{ère} Partie : Rappels bibliographiques

CHAPITRE 1 : Généralité sur le VIH

1. Histoire de l'infection à VIH

1.1. Classification

Le Virus de l'Immunodéficience Humain (VIH) fait partie de la famille des *Rétroviridae* caractérisée par la présence d'une enzyme, la transcriptase inverse qui permet de retro-transcrire l'ARN viral en ADN. Les rétrovirus peuvent être classés en deux grandes catégories : les rétrovirus exogènes (qui ne sont pas présents naturellement dans l'organisme et qui ont besoin d'infecter pour effectuer leur cycle de réplication) et les rétrovirus endogènes (le matériel génétique est présent au sein du génome de l'hôte et qui n'est pas généralement exprimé). Selon l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), les rétrovirus exogènes peuvent être subdivisés en 7 genres regroupés en deux sous-familles : les *orthoretrovirinae* (regroupant les genres *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*) et les *spumaretrovirinae* (regroupant le genre *Spumavirus*). Le genre *lentivirus* peut être subdivisé selon la base des hôtes qu'ils infectent (primates, les moutons et les chèvres, les chevaux, les chats et bovins) en 5 « sous-genre » et le VIH tout comme le VIS fait partie du « sous-genre » des lentivirus de primates. Les lentivirus sont caractérisés essentiellement par des pathologies à évolution lente et un caractère cytopathogène (destruction des cellules hôtes).

1.2. Origine du VIH

L'origine de l'infection à VIH serait simienne selon la communauté scientifique et cette théorie serait fondée sur des analyses phylogénétiques des lentivirus qui établissent l'existence d'un ancêtre commun entre le VIH et le VIS (Virus d'Immunodéficience Simien). Une recombinaison entre le SIVgsn et le SIVrcm aurait probablement eu lieu chez le chimpanzé et ce virus recombinant est à l'origine de l'ancêtre commun de la lignée SIVcpz, lequel fut par la suite transmis à l'homme (**Bailes et al., 2003**).

Les virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 et VIH-2 sont le résultat de plusieurs transmissions inter-espèces de virus simiens à l'homme. Il a été montré que le SIVcpzPtt, à l'origine du VIH-1 des groupes M et N, est toujours présent dans les populations de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* du Sud Cameroun. L'ancêtre du VIH-1 du groupe O est présent chez le gorille de l'Ouest (*Gorilla gorilla*)

mais les chimpanzés sont le réservoir original du SIVgor et il reste à établir si le VIH-1 du groupe O a été transmis à l'homme par le gorille et/ou le chimpanzé (**Keele et al., 2006**). Au moins huit transmissions inter-espèces de SIVsmm ont eu lieu entre l'homme et le mangabey enfumé, correspondant aux 8 groupes HIV-2 (**Peeters et al., 2008**).

D'après des analyses phylogénétiques, la transmission inter-espèces a eu lieu le plus probablement en Afrique Équatoriale de l'Ouest, aire de répartition des gorilles de l'Ouest et du chimpanzé *P. t. troglodytes*. Ainsi l'origine des quatre groupes de virus VIH-1 serait l'Afrique Centrale (**Peeters et al., 2008; Plantier et al., 2009**).

1.3. Découverte du VIH

Les premiers cas de SIDA ont été découverts en 1981 par le CDC aux États-Unis après l'annonce d'une recrudescence dans les villes de Los Angeles, San Francisco et New York de cas de pneumonies et de sarcomes de Kaposi. À partir de 1982, avec les premiers cas identifiés en France, la recherche française débutait et en 1983 un examen au microscope électronique avait permis de visualiser pour la première fois le virus. Ce nouveau rétrovirus était alors appelé Lymphadenopathy Associated Virus (LAV) (**Barre-Sinoussi et al., 1983**). À ce stade le lien entre le LAV et le SIDA n'était pas clairement établi par l'équipe de Luc Montagnier. En 1984, l'équipe de Robert Gallo publia dans Sciences les résultats de l'isolement d'un virus qu'il considérait comme responsable du Sida et le nommait HTLV-3 (**Popovic et al., 1984**). L'équipe de Jay A. Levy à San Francisco faisait de même le 24 août 1984 et trouvait plusieurs rétrovirus, qu'elle nommait AIDS-related virus (**Levy et al., 1984**).

En 1985, le séquençage du LAV était réalisé par une équipe de l'Institut Pasteur qui publiait ses résultats dans Cell (**Wain-Hobson et al., 1985**). C'est cette même année qu'il avait été confirmé que les trois virus (LAV, HTLV-3 et ARV) étaient identiques.

En 1986, les résultats de l'étude d'un patient venant d'Afrique de l'Ouest avaient permis d'identifier un nouveau type de LAV, le LAV-2 (**Clavel et al., 1986**). Le séquençage du nouveau virus était réalisé l'année suivante, ainsi que la mise au point d'un test de dépistage. Durant la même année, le LAV (ainsi que les autres dénominations) était officiellement renommé en virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le LAV-1 devient VIH-1 et le LAV-2, le VIH-2.

La communauté internationale prend conscience de la gravité de l'épidémie qui se transforme rapidement en pandémie et c'est ainsi qu'en 1987, l'Assemblée Générale

des Nations Unies vote une résolution invitant tous les États et toutes les agences onusiennes à coopérer pour lutter contre cette pandémie.

2. Biologie du VIH

Le VIH-1 a été isolé et décrit en 1983 par l'équipe française de Luc Montagnier (**Barre-Sinoussi *et al.*, 1983**). Même si sa morphologie et son organisation moléculaire sont assez bien connues, il reste beaucoup à élucider sur les fonctions de ses différents gènes et leurs interactions avec les composants de la cellule hôte.

2.1. Structure et organisation génomique

2.1.1. Structure du VIH

Au microscope électronique, le virion mature se présente sous forme d'une particule sphérique enveloppée de 80-120 nm de diamètre (Figure 1). Comme tous les *lentivirus*, le VIH est constitué de :

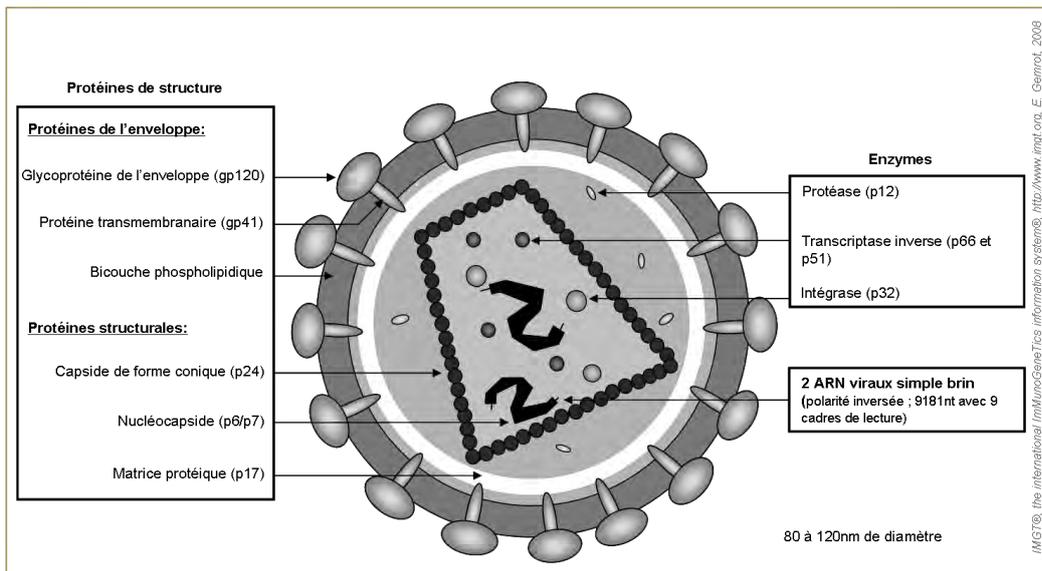


Figure 1 : La particule virale du VIH-1

(<http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/MHC/FR/Presentation/images/HIV.png>, consulté le 02/04/2015)

✓ L'enveloppe virale :

Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique et de deux glycoprotéines : la gp120^{SU} et gp 41TM. La molécule gp 41 traverse la bicouche lipidique tandis que la molécule gp120 occupe une position plus périphérique. L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte et contient ainsi des protéines membranaires de cette dernière parmi lesquelles les antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), l'actine et

l'ubiquitine (**Arthur et al., 1992**). Pour le VIH-2, les équivalents respectifs des glycoprotéines gp120 et gp 41 sont la gp125 et de la gp36.

- **Glycoprotéine de surface ou gp120^{SU}**

La glycoprotéine de surface gp120 est composée d'environ 480 acides aminés (aa). Elle est organisée en cinq régions constantes (C1-C5) dont les séquences sont semblables quelle que soit la souche virale et cinq régions variables (V1-V5) appelées boucles variables, ce qui montre une grande variabilité inter-souches (**Pancera et al., 2005**). Les régions variables V1-V4 sont ancrées à leur base par des ponts disulfures et masquent les sites de liaison du récepteur CD4 et des co-récepteurs, CXCR4 ou CCR5 (**Pancera et al., 2005; Starcich et al., 1986**).

- **Glycoprotéine transmembranaire ou gp41TM**

La glycoprotéine Gp41 contient un domaine N-terminal fusogénique, promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminal de la Gp120 par des liaisons non covalentes (**Pancera et al., 2005**). Du point de vue structural, la gp 41 est un trimère composé de 340 aa et composée de 3 domaines : un ectodomaine N-terminal d'environ 180 acides aminés qui contient quatre sites de N-glycosylation, un pont disulfure qui intervient dans la formation des complexes trimériques, une ancre transmembranaire et un long domaine intra cytoplasmique contenant des motifs variés qui contribuent à la réplication virale (**Center et al., 2002; Chan et al., 1997**).

- ✓ **Matrice virale p17^{MA}**

Constituée par la protéine p17, la matrice participe à la stabilité de la structure virale, grâce à sa liaison avec la bicouche phospholipidique qui sert d'enveloppe virale. La protéine de la matrice p17MA est impliquée dans les 2 phases (précoce et tardive) de la réplication virale et dans la production de particules infectieuses. Elle est aussi impliquée dans le recrutement et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (gp120/gp41) à la surface des virions (**Davis et al., 2006; Murakami, 2012**). La p17^{MA} est essentielle à la pénétration du virus dans les cellules par la régulation de la fusion entre les deux membranes virale et cellulaire (**Murakami et al., 2004**).

✓ La Capside p24^{CA}

C'est la protéine majeure du core du virus. Il s'agit d'une protéine phosphorylée de 24kD qui se présente sous forme d'oligomérique. Elle se condense autour du génome viral pour générer la nucléocapside de forme conique qui comprend 2 domaines indépendants. Les deux domaines de la capsid sont reliés de manière covalente par un lien flexible (**Gamble et al., 1997**) et ils semblent être eux-mêmes exceptionnellement flexibles (**Mateu, 2009**).

✓ La protéine p7 NC

La p7 NC est une petite protéine fortement basique de moins de 100 acides aminés. Elle se lie à l'ARN génomique dont elle assure l'encapsidation dans le virion en assemblage (**D'Souza and Summers, 2005**). Elle est indispensable à la dimérisation de l'ARN viral (**Feng et al., 1999; Song et al., 2007**) et permet l'initiation de la transcription inverse en favorisant l'accrochage de l'amorce de transcription, l'ARN_t^{Lys} (**Graham et al., 2011; Hargittai et al., 2001**).

✓ La protéine p6

La protéine p6 est importante pour l'incorporation de la protéine accessoire Vpr à laquelle elle est associée (**Kondo et al., 1995**). Elle jouerait également un rôle important dans le recrutement et l'encapsidation des protéines Pol dans le virion en assemblage (**Yu et al., 1998**) et intervient dans le relargage des virions (**Huang et al., 1995**).

✓ Les peptides p1 et p2

Ils permettent la régulation de l'activité de la protéase. La p2, située entre les protéines de la capsid et la protéine de la Nucléocapsid, est essentielle à l'assemblage et à la production de particules virales infectieuses (**Guo et al., 2005; Krausslich et al., 1995**). Le site p2/NC serait de loin le site de clivage le plus variable. Avec la diversité intra sous type, cette variation serait de 18,66% dans le sous-type B, plus importante pour les sous-types non B, elle atteindrait 42,42% dans le sous-type C (**de Oliveira et al., 2003; Liegeois et al., 2013**).

2.1.2. Organisation génomique du VIH

Les génomes du VIH-1 et VIH-2 partagent entre eux, une homologie d'environ 60% pour les gènes les plus conservés (*gag* et *pol*) et entre 30 à 40% pour les autres

gènes, y compris *env* et les LTRs (**Guyader et al., 1987**). Le génome du VIH-1 est caractérisé par une grande variabilité et un polymorphisme d'une souche à une autre, cependant la structure génétique est toujours similaire (figure 2). Le génome du VIH-1 est d'une longueur de 9.2 kb et contenant des gènes qui sont au nombre de neuf. Ces gènes sont classés suivant trois groupes fonctionnels en gènes de structure (*gag*, *pol* et *env*), gènes accessoires composés par les gènes régulateurs (*tat* et *rev*) et les gènes auxiliaires (*vpu*, *vpr*, *vif* et *nef*). Neuf cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames, ORFs) sont présents, chacun correspondant à un gène. L'ARN viral est flanqué à ses extrémités des séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaisons à des protéines cellulaires : ce sont les LTR (Long Terminal Repeat).

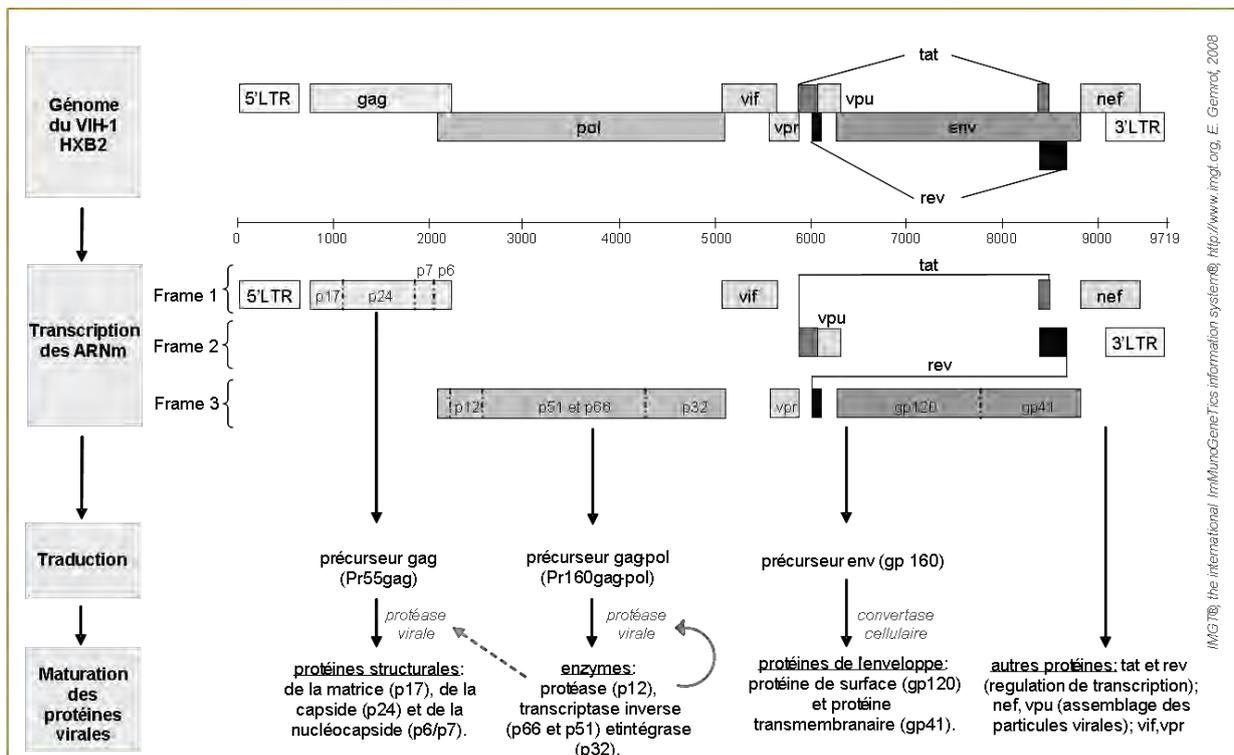


Figure 2. Organisation du génome du virus VIH et expression des gènes (**Korber et al., 1998**; **Nielsen et al., 2005**)

2.1.2.1. Les LTR (Long Terminal Repeat)

Les LTR (Long Terminal Repeat) constituent deux domaines du génome viral non codants. Elles sont composées de trois régions : U5, R, U3. Ces régions sont impliquées dans l'initiation de la rétrotranscription et l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (**Perkins et al., 1993**). Le LTR 5' est pour la

plupart des rétrovirus, l'équivalent des régions promotrices des gènes cellulaires (figure 3). La région U3 comprend des sites de liaisons pour des facteurs de transcription cellulaires dont le NF-kB (séquence stimulatrice ou enhancer : généralement 2 sites successifs), le SP1 (3 sites de fixation) ou encore la boîte TATA, signal de démarrage de la transcription de l'ARN messager. Le site de démarrage de la transcription se trouve à la jonction U3/R. Le NF-kB est présent dans tous les isolats des VIH-1 et VIH-2, cependant, les souches virales du sous-type C du VIH-1 en renferment 3 à 4 copies (**Montano et al., 1997; Neogi et al., 2011**). Le taux de transcription du sous-type C qui plus important en comparaison aux autres sous-types, serait lié à cette particularité, ce qui expliquerait en partie sa prédominance dans le monde avec environ 50% (**Bachu et al., 2012**).

Les sites de fixation du facteur SP1 ont la propriété de réguler non seulement d'autres facteurs de transcription cellulaire, d'interagir avec la protéine Tat mais aussi avec le NF-kB pour induire la transcription (**Perkins et al., 1993**).

2.1.2.2. Les gènes de structure

2.1.2.2.1. Le gène *gag* (gène des antigènes de groupe)

Le gène *gag* est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. D'environ 1500 pb, le gène code pour la polyprotéine Pr55^{Gag} N-myristylée qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsid (CA), la Nucléocapsid (NC) et la p6 (figure 3). La protéine Gag est nécessaire à l'assemblage et au bourgeonnement de particules virales à la surface des cellules infectées (**Shehu-Xhilaga et al., 2001**). Au cours de la maturation, le clivage de la Pr55^{Gag} par la protéase virale (*Pr*) donne les protéines structurales du virion mature p17MA, p24CA, p7NC, p6, plus 2 petits fragments p1gag et p2gag (**Adamson, 2012; Freed, 1998; Turner and Summers, 1999**)

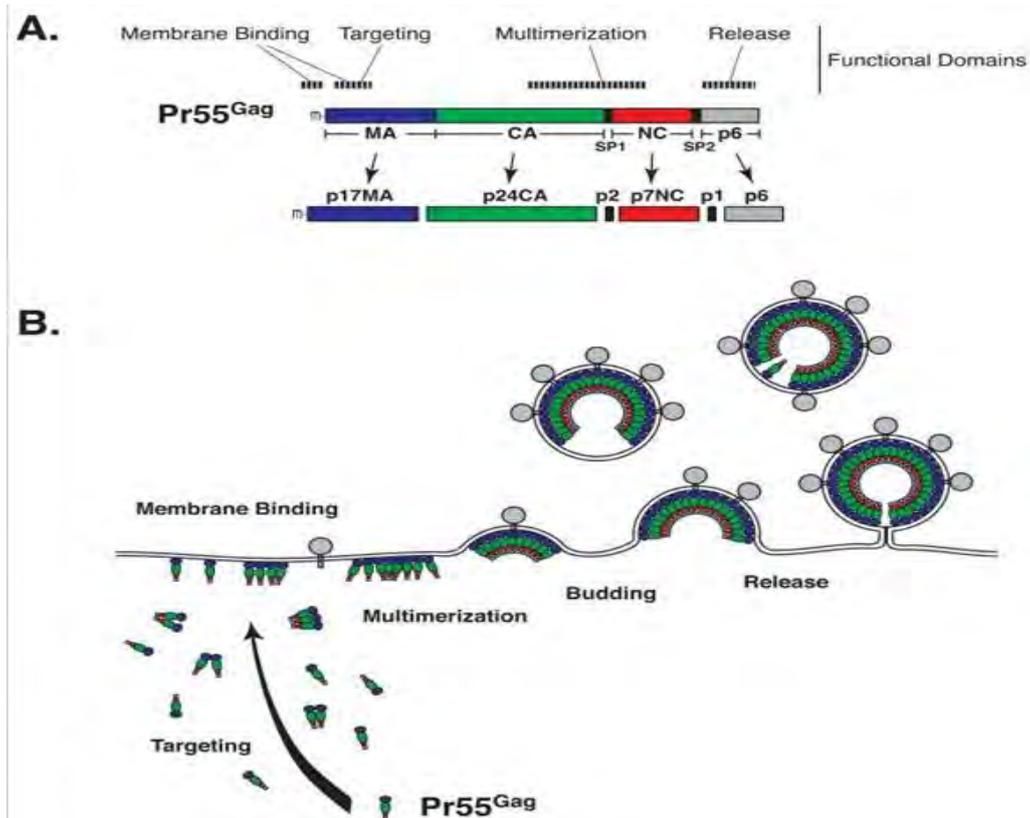


Figure 3 a et b : Organisation du gène *gag* et production des particules virales (Ono, 2009). a : Organisation génomique du gène *gag* et sites fonctionnels ; b : Interaction entre la protéine Pr55^{Gag} et la membrane phospholipidique

2.1.2.2.2. Le gène *pol* (gène codant pour les enzymes virales)

C'est le gène le plus conservé du génome viral avec une divergence intra sous-type d'environ 9 à 11% (Santos and Soares, 2010). Il code pour les 3 enzymes virales, protéase (PR), transcriptase inverse (TI) et intégrase (IN) qui sont obtenues après clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol}. La Pr160^{Gag-Pol} est une polyprotéine engendrée parallèlement au précurseur Pr55^{gag} mais en moindre quantité. Il est incorporé sous forme non clivée dans la particule virale. Son clivage intervient lors de la maturation. Le clivage de la polyprotéine Pr160^{Gag-Pol} se fait par la partie enzymatique de ce précurseur (protéase) ainsi que le précurseur Pr55^{Gag}. Lors de la maturation, la proportion relative de chacun de ces 2 précurseurs influence sur le pouvoir infectieux des virus néoformés (Shehu-Xhilaga et al., 2002).

✓ La protéase virale PR

La protéase appartient à la famille très conservée des aspartyl-protéases dont le résidu catalytique est un acide aspartique (résidu 25). C'est l'enzyme essentielle à la maturation et la production de particules virales infectieuses. Indispensable au

processus post-traductionnel, elle assure le clivage des polyprotéines Pr55^{Gag} et P160^{Gag-Pol}. Sous sa forme active, elle se présente structurellement, sous forme d'un homodimère de 99 aa (**Swanstrom and Wills, 1997**). Les deux monomères sont liés de façon non covalente et symétrique par 4 chaînes β -antiparallèles (Figure 4). L'activité enzymatique de la protéase est assurée par 2 molécules d'acide aspartique situées au cœur du site catalytique de l'enzyme constitué par la triade Asp-Thr-Gly aux positions 25 à 27. Cette triade conservée se trouve à la jonction des deux monomères ; elle forme ainsi un tunnel, permettant une interaction avec 7 à 9 acides aminés, dont l'activité aboutit au clivage de 9 séquences peptidiques différentes.

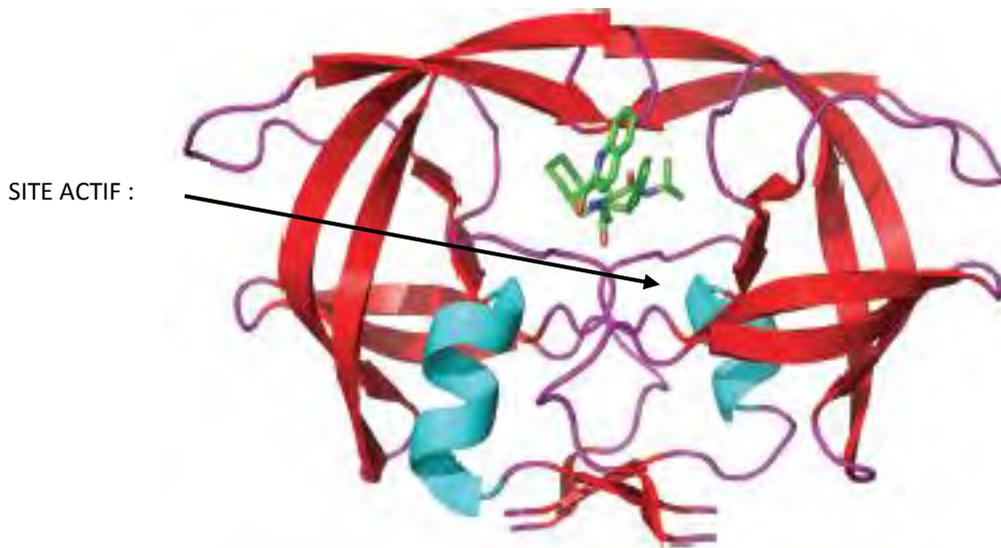


Figure 4: Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 : en vert, un inhibiteur de protéase (le saquinavir) lié au site actif de l'enzyme (**Adamson, 2012**).

✓ La transcriptase inverse TI ou Reverse Transcriptase (RT)

Il s'agit d'une enzyme ADN polymérase ARN/ADN dépendante, dotée d'une activité RnaseH. C'est l'enzyme qui assure la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral. Lors du cycle de réplication, elle fait survenir de nombreuses erreurs de copie, du fait de son taux élevé de réplication virale et en l'absence d'une fonction correctrice, ce qui la rend responsable de la grande diversité génétique du VIH.

La structure de la transcriptase inverse se présente sous forme d'un hétérodimère constitué de 2 sous unités, la P66 et la P51 (**di Marzo Veronese et al., 1986**). La grande sous unité, la P66 (560 aa) comprend les 2 domaines fonctionnels de la RT : la polymérase et le domaine RNase H. La petite sous-unité (P51) contient les 440 premiers aa de la P66 correspondant (mais pas entièrement), au domaine de la

polymérase. La P51 ne possède pas d'activité enzymatique et ne joue pas de rôle direct dans le processus de polymérisation (**Kohlstaedt et al., 1992**). La fonction primaire de la P51 se limiterait uniquement au maintien de la structure active de la P66 (**Hughes, 2001; Mulky and Kappes, 2005**).



Figure 5 : Schéma de la transcriptase inverse (dans un complexe avec un acide nucléique) avec ces deux sous unités (p66 et p51) et leurs sous domaines. (**Sarafianos et al., 2009**).

✓ L'intégrase IN

C'est l'intégrase qui catalyse l'insertion de l'ADN double brin néo-synthétisé dans le génome de la cellule infectée. Il s'agit d'une protéine de 288 aa, obtenu par clivage protéase-dépendante de la polyprotéine Gag-Pol qui comprend 3 domaines indépendants (figure 6) : un domaine N-terminal avec un motif en doigt de zinc (**Zheng et al., 1996**), un domaine central ou domaine catalytique impliqué dans la liaison avec les extrémités de l'ADN viral (**Johnson et al., 2006; Nowotny, 2009**) et un domaine C-terminal qui lie l'ADN viral de façon non spécifique et qui participe essentiellement à la stabilité du complexe ADN-IN (**Chen et al., 2000**).

L'intégrase (IN) fonctionne sous forme d'oligomère. Il semble que chacun des domaines de la protéine participe à cette oligomérisation (**Hare et al., 2009**). Elle possède 2 activités catalytiques majeures :

- un clivage endonucléolytique au niveau des extrémités 3'-OH du génome viral préparant l'ADN au processus d'intégration.

- Au cours de la deuxième étape, dite de transfert de brins, chaque groupement 3'-OH généré par excision intègre l'ADN viral dans le génome cellulaire via un mécanisme de trans-estérification (**Jaskolski et al., 2009**).

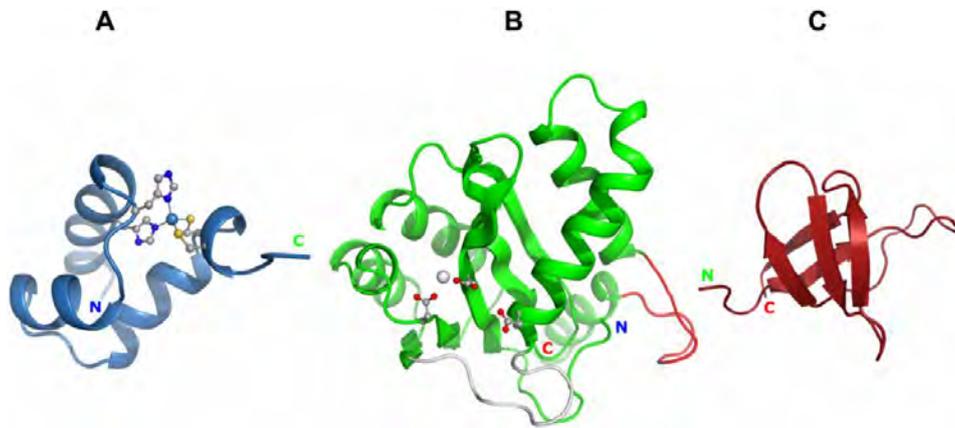


Figure 6 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH.

Le domaine N-terminal en bleu (A), le domaine CCD en vert avec les résidus DDE en petites boules rouge (B) et le domaine carboxy-terminale en rouge (C) (**Jaskolski et al., 2009**).

2.1.2.2.3. Le Gène *env* (gène codant pour les protéines de l'enveloppe)

Il code pour les glycoprotéines d'enveloppe, gp120SU et gp41TM équivalents respectivement pour le VIH-2 aux gp125 et gp36. Ils sont responsables de la fixation du virus sur le récepteur cellulaire et son entrée dans la cellule hôte. Leur emplacement sur la surface du virus fait d'eux des cibles idéales pour les anticorps neutralisants (**Center et al., 2002**). Le gène *env* est le gène viral le plus variable. Son polymorphisme important permet au virus d'échapper au système immunitaire (**Arrildt et al., 2012**).

Les glycoprotéines sont initialement synthétisées sous forme d'un précurseur polyprotéique, la gp160 qui sera modifiée par glycosylation avant d'être clivée par une protéase cellulaire en 2 protéines (gp120 et gp41) (figure 7).

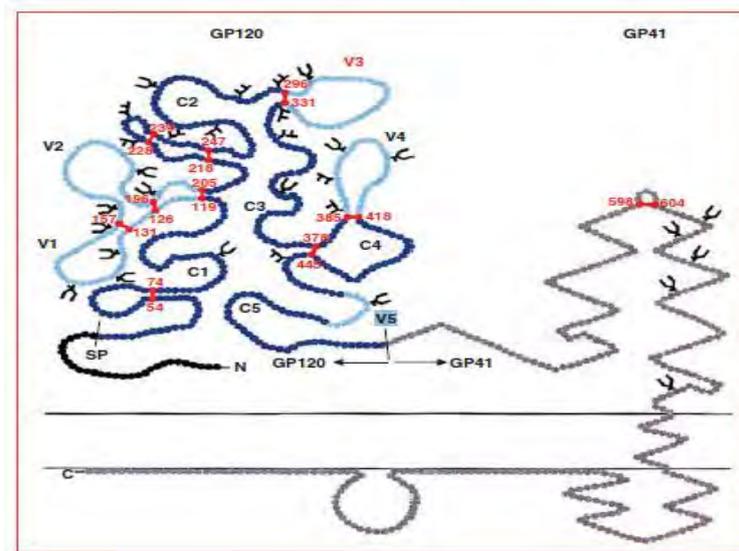


Figure 7: Représentation schématique du précurseur gp160. (Pancera *et al.*, 2005).

2.1.2.2.4. Les gènes accessoires

Ce groupe est composé de six gènes qui codent pour des protéines virales dont les rôles ne sont pas encore complètement élucidés. Les 2 protéines Tat et Rev, encore appelées protéines de régulation, sont nécessaires à la réplication virale. Les autres gènes (*vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*), sont qualifiés de gènes auxiliaires. Leur implication dans le cycle réplcatif est prouvée. En effet, ils interviennent dans le cycle réplcatif et interagissent avec des facteurs cellulaires. Ils interfèrent dans l'expression de certains gènes cellulaires, altérant ainsi le bon fonctionnement des cellules infectées. Enfin, leurs rôles dans l'infectiosité du virus et dans la pathogénicité semblent de plus en plus établis.

2.1.2.2.4.1. Les gènes de régulation

- **Le gène *tat* (*trans-activator of transcription*)**

C'est un petit gène codant pour une protéine de 86 à 101 aa (Zhou and Sharp, 1995). Il est formé de deux exons qui codent pour les protéines p16 Tat et p14 Tat, toutes deux fonctionnelles. La fonction essentielle du gène *tat* est d'activer la transcription des ARNm viraux. Il agit en activant la réplication virale au niveau d'une séquence cible appelée TAR (TransActing Region) située dans le LTR (Brady and Kashanchi, 2005; Weeks *et al.*, 1990). Sans la protéine Tat, la transcription est très vite arrêtée et ne permet plus la synthèse d'ARNm fonctionnels (Cullen, 1990). L'activation de la transcription peut également être TAR dépendante soit par une liaison directe de Tat sur le NF- κ B (Dandekar *et al.*, 2004), soit par liaison avec la

protéine histone chaperonne hNAP-1 (**Vardabasso et al., 2008**). Tat peut également agir comme une toxine virale contribuant à la pathogenèse du SIDA.

- **Le gène *rev* (regulator of expression virus)**

C'est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression et à la maturation virale. Il code pour la phosphoprotéine pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule-hôte. Il intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure en assurant la stabilisation et le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme (**Karn and Stoltzfus, 2012**). Le site de reconnaissance de la protéine sur l'ARN est le domaine RRE (*Rev Responsive Element*) qui est une séquence du gène *env*, et ce sont plusieurs monomères de Rev qui vont de façon séquentielle se lier au RRE (**Hoffmann et al., 2012; Pollard and Malim, 1998; Pond et al., 2009**). *Rev* est rapidement recyclé entre le cytoplasme et le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NSE). Par ailleurs, des études récentes ont fourni la preuve que *Rev* neutralise également l'intégration du VIH-1 et facilite l'encapsidation de l'ARN du génome viral (**Hoffmann et al., 2012**).

2.1.2.2.4.2. Les gènes auxiliaires

- **Le gène *vif* (virion infectivity factor)**

Le gène *vif* code pour une protéine basique de 23 KD, il intervient dans l'infectivité mais pas dans la production des particules virales. En effet l'absence de la protéine vif entraîne la production de particules virales défectueuses alors que la transmission des virus d'une cellule à une autre n'est pas significativement affectée. Cette protéine Vif existe à des taux élevés sous une forme libre dans le cytosol (**Li et al., 2005**). Vif est un facteur important car il s'oppose à l'encapsidation d'une protéine cellulaire anti-virale, l'APOBEC3G (**Schafer et al., 2004**). Il s'agit d'une cytidine désaminase qui, en entraînant la désamination des desoxycitidines, va être responsable de la formation d'un ADNc de mauvaise qualité qui sera éliminé par le système de réparation de la machinerie cellulaire (**Kourteva et al., 2012; Li et al., 2007**). Vif, se lie directement à APOBEC3G et favorise sa dégradation suite au recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase qui va accélérer sa polyubiquitylation et sa destruction par les protéasomes (**Goila-Gaur and Strebel, 2008**). Cependant, il a été démontré

qu'une substitution spécifique d'un seul acide aminé dans l'APOBEC3G humaine conférait une résistance à l'action de Vif (**Xu et al., 2004**).

- **Le gène *vpr* (viral protein R)**

Il code pour une protéine de 14 kD et qui est localisée dans le noyau. L'encapsidation de cette protéine nécessite une coopération entre la p7^{NC} et la portion p6 de la polyprotéine Pr55^{gag}. Il contribue à la pathogenèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR et le transport du complexe de pré intégration dans le noyau (**Le Rouzic and Benichou, 2005**). Intervenant dans la transcription inverse, elle influence la fidélité de l'enzyme dont le taux d'erreur est réduit d'environ 4 fois grâce à son interaction avec l'uracil DNA glycosylase (UNG) (**Chen et al., 2004; Mansky et al., 2000**). Elle est présente dans le complexe de pré-intégration et facilite le transport de l'ADN dans le noyau par son interaction avec la machinerie cellulaire responsable du trafic nucléo-cytoplasmique (**Le Rouzic et al., 2002**).

- **Le gène *vpu* (viral protein U)**

Il est retrouvé dans le génome du VIH-1 du SIV_{cpz} et absent dans le génome du VIH-2, il est remplacé par le gène *Vpx* (**Tristem et al., 1992**). Il code pour une protéine de 81 aa qui s'accroche à la membrane cellulaire via son extrémité N-terminale. Cette protéine a 2 fonctions essentielles : la dégradation des molécules CD4 nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique et la stimulation du relargage des virions (**Hussain et al., 2008; Mitchell et al., 2009**).

- **Le gène *nef* (negative expression factor)**

Il code pour une protéine très conservée de 24-32kD myristillée en N terminale et qui est une des premières à être synthétisées dans les cellules infectées. Cette protéine est retrouvée essentiellement dans le cytoplasme, mais aussi sous forme associée à la membrane plasmique par l'intermédiaire du résidu myristyl. Elle contribue à la pathogenèse du VIH à travers multiples effets biologiques favorisant la réplication virale et l'infectivité et la persistance (**Miller et al., 1994; Roeth and Collins, 2006**). Nef favorise l'infection virale par activation des lymphocytes T CD4 qui deviennent ainsi plus sensibles à l'infection et Il inhibe également l'expression des molécules responsables du pouvoir cytotoxique sur le VIH à la surface des cellules cytotoxiques appelées aussi NK ou Natural Killer (**Matusali et al., 2012**).

2.2. Réplication virale et évolution de l'infection

2.2.1. Tropisme

L'utilisation par le virus de l'un ou l'autre de ces corécepteurs détermine le tropisme de la souche virale (**Moore, 1997**). Les souches M-tropiques utilisent principalement le récepteur CCR5 pour infecter la cellule hôte. Elles ont été de ce fait nommées R5. Les souches T-tropiques, utilisant préférentiellement le co-récepteur CXCR4 quant à elles, ont été appelées X4. Une troisième population virale désignée R5X4 ou dual-tropic est capable de se fixer aussi bien sur le co-récepteur CCR5 que sur le co-récepteur CXCR4 (**Church et al., 2010; Goodenow and Collman, 2006**). Comme les isolats viraux X4, les virus R5X4 sont corrélés à une forte dépression en lymphocytes T et l'apparition d'infections opportunistes liées au SIDA (**Waters et al., 2008**). Le tropisme viral est principalement lié à l'identité de certains acides aminés présents dans la boucle variable V3 de la gp120 (**Bunnik et al., 2011**).

2.2.2. Réplication virale du VIH

Entre le moment où il se fixe sur la surface de la cellule cible et l'intégration de son génome dans le noyau cellulaire, pour se répliquer et assurer sa survie, le VIH va devoir déjouer beaucoup d'obstacles et détourner le fonctionnement de sa cellule hôte (**Nisole and Saib, 2004**). Ce processus qui aboutit à la naissance de nouveaux virions est soumis à la régulation des protéines virales et cellulaires et provoque de façon précoce de grandes perturbations au niveau de la cellule hôte (**Navare et al., 2012**).

Le cycle de réplication est composé de plusieurs étapes pouvant être divisées en 2 phases : Une phase précoce qui commence par l'attachement du virus sur son récepteur spécifique et finit par l'intégration de l'ADNc dans le génome cellulaire. Et une phase tardive qui débute par l'expression des gènes viraux et aboutit à la libération des virions par bourgeonnement à la surface de la membrane cellulaire. La cible principale du VIH est la cellule T CD4+ (**Barre-Sinoussi et al., 1983**).

2.2.2.1. Phase précoce :

- **L'attachement des particules virales**

Le cycle de réplication du VIH, semblable à celui des autres rétrovirus débute par l'adsorption du virus sur la cellule cible. Cet attachement est le résultat d'une interaction entre la gp120 et une variété de molécules dont la protéoglycane

héparane sulfate présentes sur la membrane des cellules hôtes. Cette molécule, qui constitue le facteur d'attachement le plus utilisé par les virus enveloppés et notamment le VIH, permet de concentrer les virus à la surface des cellules cibles afin d'augmenter la probabilité de sa liaison avec les récepteurs spécifiques (**Crublet et al., 2008; Mondor et al., 1998**). L'héparane sulfate est également impliquée dans la capture et l'attachement des particules virales à la surface des spermatozoïdes qui vont, de façon efficace transmettre les virus aux cellules dendritiques (CD) par un contact de cellule à cellule (**Ceballos et al., 2009**). Les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans l'attachement des particules virales par l'intermédiaire d'une lectine nommée DC-SIGN (Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) et DC-SIGNR (DC-SIGN related) (figure 8). L'interaction entre gp120 et DC-SIGN permet au virus d'utiliser les cellules dendritiques comme un moyen infallible de capture des virions au niveau des sites périphériques d'infection et de transport vers les ganglions lymphatiques (**Donaghy et al., 2006; Pohlmann et al., 2001**). Outre ses fonctions de capture et facilitation d'entrée du VIH et sa capacité à pouvoir transmettre des virions aux lymphocytes, la molécule DC-SIGN, possède un remarquable pouvoir d'amplifier l'infection virale. Ce phénomène remarquable a été rapporté uniquement pour le VIH (**Geijtenbeek et al., 2000b**).

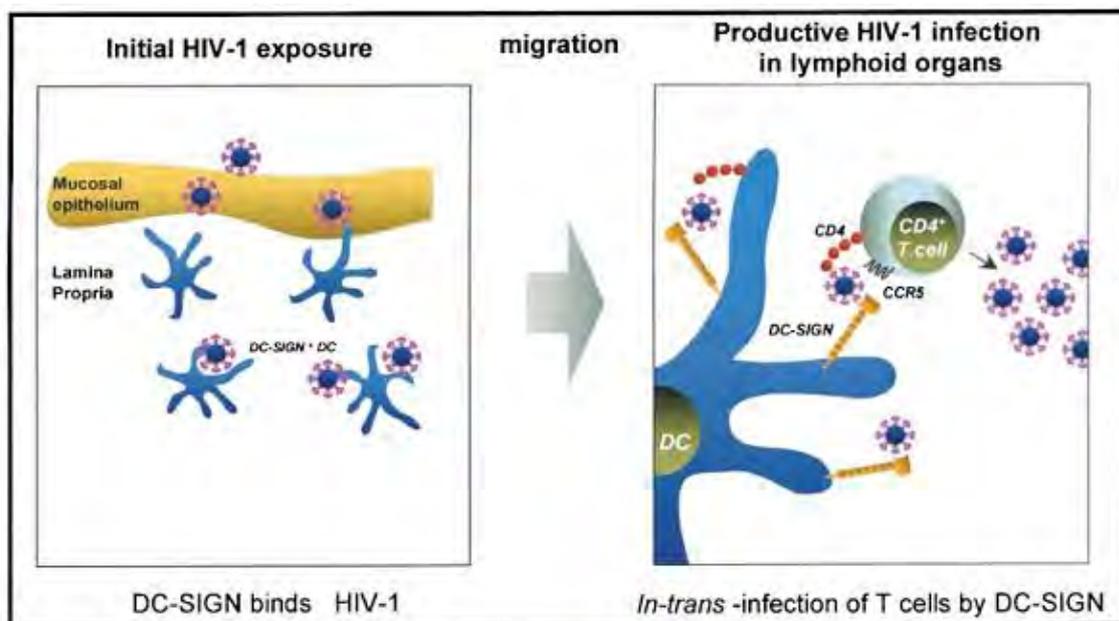


Figure 8 : Mode de capture du VIH par les cellules DC-SIGN (**Geijtenbeek et al., 2000a**)

La cellule DC-SIGN constitue la cible primaire du VIH lors d'une exposition mucosale. Le VIH-1 adhère à cette cellule et migre vers les tissus lymphoïdes et le VIH est ensuite présenté par la cellule DC-SIGN aux cibles secondaires (cellules T) pour une infection productive et durable.

- **L'entrée**

L'entrée du virus dans la cellule cible fait intervenir les glycoprotéines de l'enveloppe virale et des récepteurs cellulaires spécifiques (figure 9). C'est ainsi que la gp120 reconnaît à la surface de la cellule, le récepteur CD4. L'association entre les deux molécules provoque au niveau de chacune d'entre-elle un changement conformationnel, permettant le recrutement des co-récepteurs de chimiokines, CXCR4 ou CCR5 (Gallo *et al.*, 2003; Pancera *et al.*, 2005).

Le changement de conformation qui s'en suit implique les régions HR1 et HR2 de l'ectodomaine de la gp41. Cette transition structurale de la gp41 est responsable du rapprochement des membranes virales et cellulaires (Melikyan *et al.*, 2000). Un dernier changement de conformation de la gp41 permet le rapprochement et la fusion des deux membranes, conduisant au transfert de la capsid virale dans la cellule cible (Este and Telenti, 2007; Pierson and Doms, 2003).

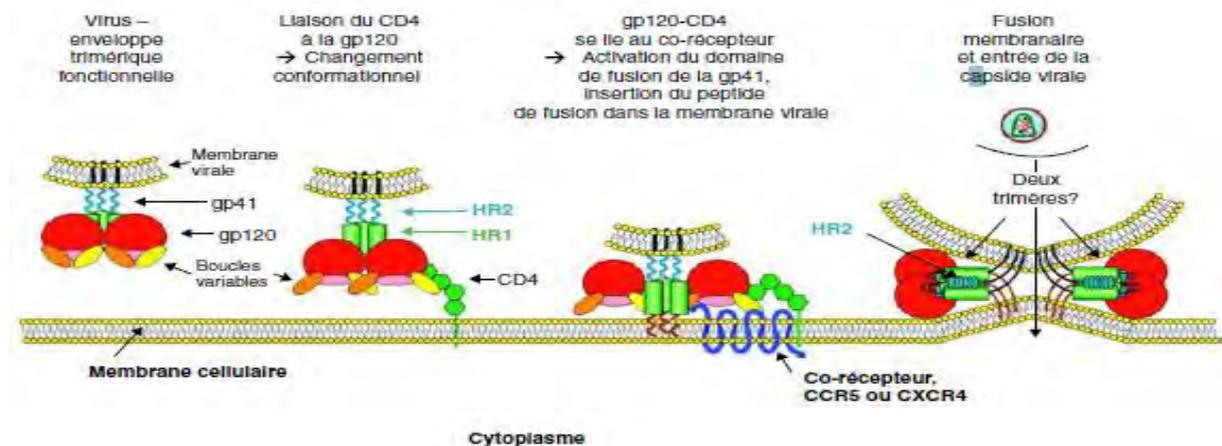


Figure 9: différentes phases de l'entrée du VIH dans la cellule hôte (Pancera *et al.*, 2005).

- **Décapsidation et transcription inverse**

Immédiatement après sa libération dans le cytoplasme cellulaire, la nucléocapside subit une décapsidation progressive qui va aboutir à la formation des complexes de transcription inverse (RTC, pour reverse transcription complexe) et de pré-intégration (PICs, pour pre-integration complexe). La décapsidation n'est pas un processus

spontané. Elle est soumise à la régulation de facteurs cellulaires, telles que des enzymes provenant du lymphocyte T CD4+ activé (**Auewarakul et al., 2005; Misumi et al., 2010**).

La transcriptase inverse (TI) dispose de deux activités enzymatiques, une ADN polymérase qui est capable de copier soit un ADN ou une matrice d'ARN et une RNase H dont le rôle est le clivage d'un ARN faisant partie d'un duplex ARN/ADN. Les deux fonctions enzymatiques de RT, la polymérase et RNase H, coopèrent pour convertir l'ARN en un ADN double brin dans le cytoplasme de la cellule infectée (**Sarafianos et al., 2009**). Le processus de transcription inverse serait régulé par des facteurs cellulaires (**Warrilow et al., 2008**) et il semblerait que son initiation soit couplée au début de la décapsidation (**Zhang et al., 2000**). L'ARN viral intégré dans le complexe de rétrotranscription de haut poids moléculaire comprenant entre autres, la transcriptase inverse, l'intégrase, Vpr, l'ARNt^{Lys}, MA et des facteurs cellulaires, va subir en plusieurs étapes une rétrotranscription en ADNc (figure 10).

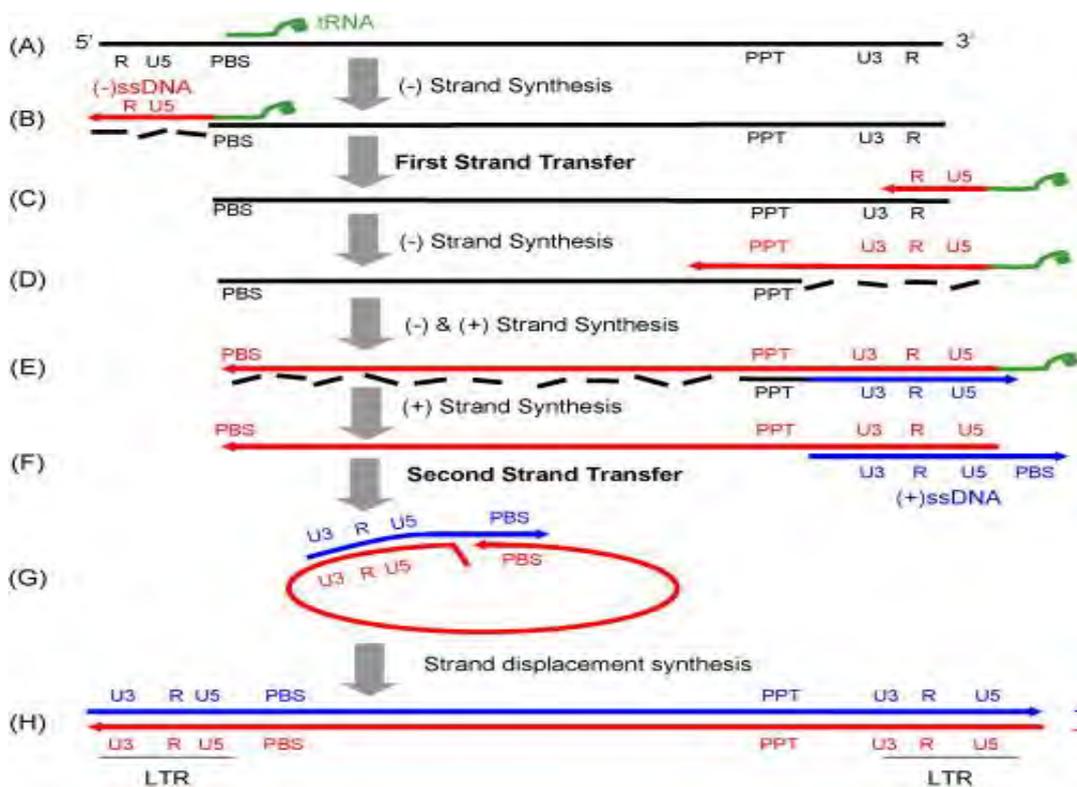


Figure 10 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral (**Basu et al., 2008**)

- **L'intégration de l'ADN viral**

L'ADN bicaténaire néosynthétisé est associé aux protéines virales MA, TI, IN et Vpr avec lesquelles il forme le complexe de préintégration. Ce dernier quitte le

cytoplasme pour se diriger vers le noyau grâce à la protéine Vpr qui va permettre sa translocation par son interaction avec un canal ionique de la membrane nucléaire. Des protéines du complexe de pré-intégration notamment, celle de la matrice et des facteurs cellulaires interviendraient dans cette étape ; cependant, leur rôle n'est pas clairement établi (**Le Rouzic and Benichou, 2005; Nitahara-Kasahara et al., 2007**). L'intégration de l'ADN viral dans celui de la cellule hôte s'effectue en deux étapes (figure 11). D'abord, l'intégrase se lie à une courte séquence au niveau des LTR qui catalyse un clivage endonucléotidique avec élimination d'un dinucléotide aux deux extrémités de chaque LTR. Ensuite, l'ADN est clivé et sert de substrat à la réaction d'intégration ou de transfert de brin conduisant à l'insertion covalente de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. Cette deuxième étape, s'effectue simultanément aux deux extrémités de la molécule d'ADN viral avec un décalage de cinq paires de bases de part et d'autre des deux points d'insertion. Enfin, l'ADN proviral ainsi intégré, subit l'action réparatrice des enzymes de la cellule hôte qui vont permettre la jonction au niveau des extrémités 5' des LTR grâce à un processus de duplication des séquences de l'ADN cible limitant le provirus intégré (**Delelis et al., 2008**). Les sites d'intégration se trouvent principalement dans les unités de transcription actives de l'ADN cellulaire (**Mitchell et al., 2004**).

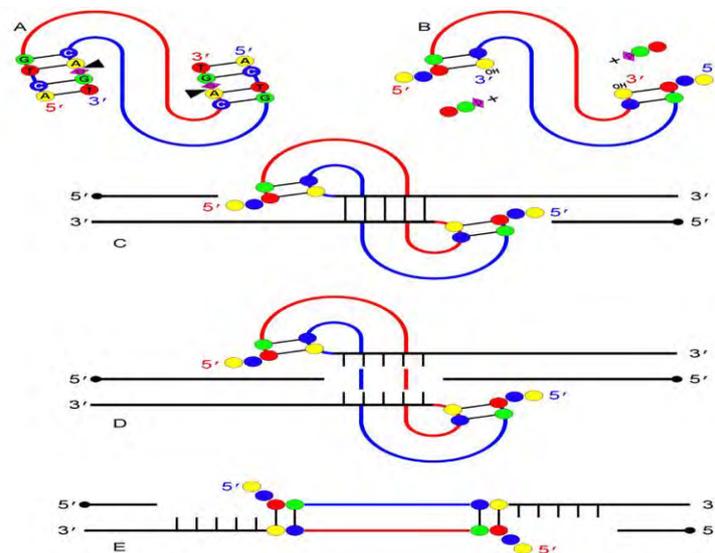


Figure 11 : Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réplication du virus (**Jaskolski et al., 2009**).

2.2.2.2. Phase tardive : Transcription - assemblage - bourgeonnement et maturation

La phase de réplication dite tardive regroupe toutes les étapes allant de la transcription du provirus intégré dans le génome de la cellule hôte à la libération de nouveaux virions matures (figure 12). Le génome intégré peut rester en latence plusieurs années, mais peut à tout moment se réactiver en réponse à une stimulation et ainsi induire la réplication du provirus. Ce phénomène constitue une limite pour les traitements antirétroviraux actuels qui ne sont actifs que sur les virus en réplication (**Pomerantz, 2002**). .

- **La transcription**

Cette transcription de l'ADN proviral est en grande partie régie par des facteurs de transcription cellulaire et se fait par l'ARNpol II cellulaire ADN dépendante. Même si ce sont les sites de régulation des LTR qui permettent l'initiation de cette transcription, la protéine Tat joue un rôle primordial. En effet, l'ARN polymérase II cellulaire est généralement activée suite à une interaction entre la protéine Tat, un motif particulier au niveau de l'élément TAR et différents facteurs cellulaires dont le NF-kB (**Brady and Kashanchi, 2005**). Après transcription de l'ADN proviral, trois catégories d'ARNm sont générées : L'ARN génomique codant pour les précurseurs Gag et Gag-Pol, les ARN mono-épissés codant pour le précurseur Env et pour les protéines Vpu, Vif et Vpr et les ARNm multi-épissés qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef. La régulation des ARNm épissés et non épissés est assurée par la protéine Rev qui assure le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme (**Pond et al., 2009**).

- **L'assemblage**

La formation du virion débute par l'auto-assemblage des molécules du précurseur Pr55^{Gag} au niveau de la face interne de la membrane plasmique, à proximité d'une zone où sont exprimées les glycoprotéines d'enveloppe (figure 12). L'assemblage du virus est un phénomène bien étudié, par contre comment le VIH-1 sélectionne des sites spécifiques sur la membrane plasmique pour amorcer son assemblage, ne l'est que partiellement (**Jouvenet et al., 2011**). Par ailleurs, le mécanisme de cet auto-assemblage, n'est pas connu avec exactitude (**Murakami, 2012**). Cet assemblage dépend principalement de Pr55^{Gag} dont l'expression est suffisante pour permettre la production de pseudo-particules virales en l'absence des glycoprotéines

d'enveloppe, de RT, de protéase et d'ARN génomique (**Gottlinger, 2001; Wills and Craven, 1991**).

- **Bourgeonnement et maturation**

Le bourgeonnement correspond au détachement de la particule virale de la surface de la cellule cible (figure 12). Ce détachement intervient après formation complète de la particule virale. Il a été mis en évidence que le détachement du virus de la cellule nécessite la protéine Vpu qui stimule le relargage des virions (**Hauser et al., 2010; Perez-Caballero et al., 2009**).

La maturation survient immédiatement après ou de façon concomitante avec le bourgeonnement des particules virales. Le virus néoformé amorce alors une modification architecturale de ses différentes protéines constitutives qui le font passer d'un état immature et non infectieux à un état mature et infectieux. Il s'agit d'un processus hautement contrôlé et séquentiel assuré par la protéase virale dont l'activation dépend de sa dimérisation et la présence du précurseur Pr160^{Gag-Pol} (**Scarлата and Carter, 2003**).

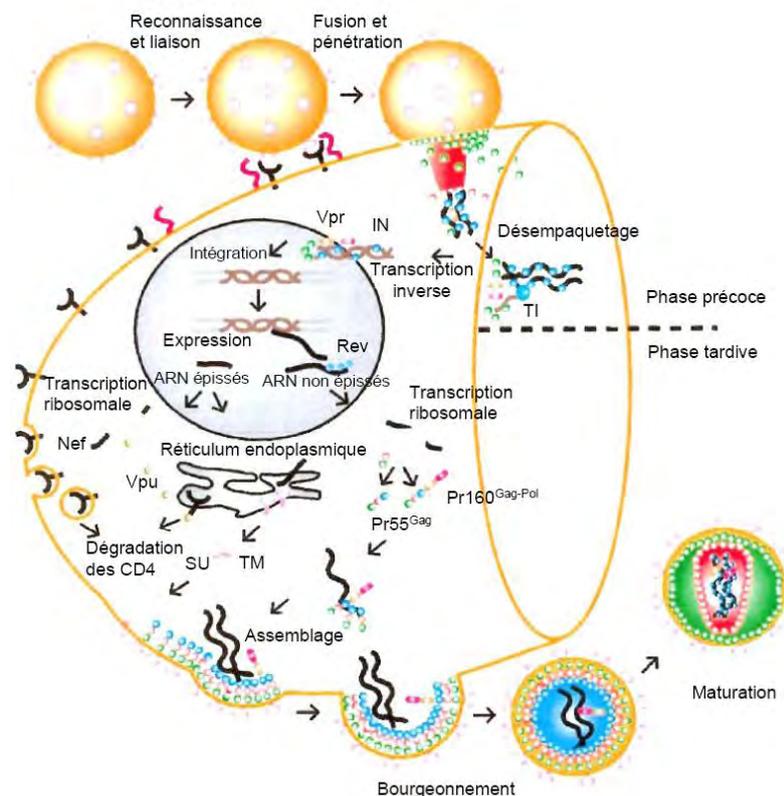


Figure 12 : Cycle de réplication du VIH-1 (**Turner and Summers, 1999**)

3. Diversité génétique du VIH

L'apparition de nouveaux variants génétiques est due à un processus évolutif dont les mécanismes sont semblables à ceux qui expliquent l'évolution de toute espèce vivante. Une des caractéristiques majeures des VIH est sa grande variabilité et elle est responsable de la classification du virus en types, groupes, sous-types, sous sous-types et formes recombinantes circulantes. Cette grande variabilité génétique du VIH s'explique par un taux de réplication très élevé combiné à la survenue de mutations aléatoires fréquentes, la sélection naturelle et les recombinaisons génétiques (**Rambaut *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 1995**).

3.1. Origine de la variabilité génétique

Trois principaux facteurs peuvent être à l'origine de la diversité génétique : les mutations aléatoires, la pression de sélection et la recombinaison génétique.

3.1.1. Les mutations aléatoires fréquentes

Le VIH présente un taux de mutations très important, plus de mille fois plus importante que dans le génome d'un humain. Ce phénomène est dû au fait que la transcriptase inverse ne présente pas d'activité 3'-5' exonucléasique. Elle n'a donc pas de système de correction d'erreurs survenant au cours de la synthèse de l'ADNc (**Bakhanashvili *et al.*, 2005**). Les erreurs sont donc fréquentes et ont été estimées à une tous les 10 000 nucléotides produits et comme le génome du VIH est composé d'un peu moins de 10 000 nucléotides, il y a approximativement entre une et 10 mutations à chaque cycle viral (**Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988**).

3.1.2. Les pressions de sélection

Elles sont de 2 types : négative et positive. La pression négative est favorisée par les erreurs de transcription et les recombinaisons produisent de nombreux virions différents les uns des autres. La plupart de ces mutations sont synonymes ou silencieuses, n'entraînant pas de changement d'aa ou de propriétés chimiques de l'aa et produisent des virions incapables de se répliquer correctement, ce qui les destine à disparaître. Et la pression de sélection positive est favorisée par substitutions d'aa (mutations non-synonymes). Parmi les virions, certains ont pour particularité d'être plus résistants aux attaques des défenses immunitaires. Cela a pour conséquence de les rendre mieux adaptés à leur milieu et finalement seuls les

virions résistants sont présents dans l'organisme. Cette variabilité est très marquée dans les gènes de l'enveloppe, particulièrement la gp120 notamment sur sa partie la plus variable, le bouclier V3 (**Kuiken et al., 1993**).

3.1.3. Les recombinaisons génétiques

Lorsqu'une cellule est infectée par deux virions génétiquement différents, les séquences peuvent se recombiner, ce qui donne naissance à des formes recombinantes. Ce processus, aléatoire, est favorisé par les comportements à risque parce qu'ils augmentent la probabilité de contaminations multiples chez une même personne. En raison de sa nature diploïde, le VIH peut augmenter son potentiel de succès évolutif par recombinaison. Le nouveau virus recombinant est donc une mosaïque contenant des séquences provenant de plusieurs génomes parentaux. Ce phénomène de recombinaison entre 2 souches distinctes peut se produire dans les deux semaines qui suivent l'infection (**Wooley et al., 1997**) ou à un stade plus avancé de l'infection et le VIH subirait 2 à 3 événements de recombinaisons par le génome par cycle de réplication (**Jetzt et al., 2000**).

On a initialement suspecté que la recombinaison entre les virus du groupe M et ceux du groupe O ne serait pas possible à cause de leur niveau élevé de divergence. Cependant, deux rapports ont documenté une recombinaison intergroupe chez deux patients différents au Cameroun (**Peeters et al., 1999; Yamaguchi et al., 2004**). Tandis qu'une double infection par VIH1 et VIH2 a été souvent rapportée dans les régions où ces deux virus circulent (**van der Loeff et al., 2006**).

3.2. Les différents groupes, sous types et formes recombinants

L'origine du VIH humain est retracée comme liée à de multiples infections zoonotiques et probablement liés aux contacts des chasseurs et bouchers avec les fluides corporelles des primates infectés par les SIV (**Kalish et al., 2005; Wolfe et al., 2004**). Deux types de VIH sont distingués, le VIH-1 provenant du SIV des chimpanzés (SIV cpz) (**Gao et al., 1999**) et le VIH-2 provenant du SIV de sooty mangabeys (SIV sm) (**Gao et al., 1992**). La multiplicité des passages des SIV à l'homme est à l'origine de l'existence des différents groupes du VIH. Le VIH-1 est à l'origine de la grande pandémie du SIDA et peut être subdivisé en quatre groupes (M, N, O et P).

3.2.1. Les différents groupes du VIH-1

Le VIH-1 groupe O (Outlier) est le groupe le plus divergent et des études ont suggéré qu'il aurait pour origine des SIV infectant les gorilles (SIV gor) ((**Van Heuverswyn et al., 2006**). Le SIV gor étant proche du SIV cpz, il est possible que les gorilles aient été des réservoirs intermédiaires du VIH-1 groupe O (**Takehisa et al., 2009**). L'épidémie de l'infection à VIH-1 groupe O est restreinte à la partie Ouest de l'Afrique Centrale et ce sont environ 15 000 personnes qui seraient infectées par ce variant au Cameroun (**Ayoubu et al., 2001; Brennan et al., 2008**).

Le VIH-1 groupe N (New) a été identifié en 1998 (**Simon et al., 1998**) et aurait pour origine une lignée de SIV cpz retrouvée chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* de la partie centrale et du Sud Cameroun (**Keele et al., 2006**). Ce variant est extrêmement rare avec moins de 50 cas qui ont été identifiés à ce jour et ils ont tous été retrouvés au Cameroun (**Ayoubu et al., 2000; Bodelle et al., 2004; Roques et al., 2004**).

Récemment, un nouveau groupe (P) a été décrit chez une femme d'origine camerounaise (**Plantier et al., 2009**). Ce groupe serait proche du SIV gor sans évidence de recombinaison avec les autres groupes du VIH-1. A ce jour, 2 cas ont été identifiés confirmant la circulation de ce variant qui pourrait exister à l'état latent au Cameroun (**Plantier et al., 2009; Vallari et al., 2010**).

Le VIH-1 groupe M (Major) est responsable de la pandémie actuelle du SIDA avec plus de 95% des personnes vivant avec le VIH. Son origine a été clairement établie et il proviendrait d'un SIV cpzPtt qui est encore retrouvé chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* du Sud-Est du Cameroun (**Keele et al., 2006**). Ce virus aurait probablement été transmis localement avant de gagner la République Démocratique du Congo à partir duquel le VIH-1 se serait propagé dans le monde (**Parris, 2007**).

3.2.2. Les différents sous-types et formes recombinantes du groupe M

Dans le début des années 1990, le séquençage et l'alignement des gènes *env* et *gag* à partir de différentes souches de VIH-1 a permis pour la première fois d'établir l'existence de clades génétiques bien définies au sein du VIH-1 M. Et c'est sur la base de cette information que les sous types A, B, C, D, E et F ont été reconnus en 1993 (lien). En 1994, les sous-types G et H ont été caractérisés en Afrique centrale

et plus tard les sous-types I (1995), J (1999) et K (2000) ont été décrits (**Janssens et al., 1994; Kostrikis et al., 1995; Laukkanen et al., 1999; Triques et al., 2000**). Selon la classification actuelle, le groupe M du VIH-1 comprend neuf différents sous-types « purs » ou formes non recombinantes (A-D, F-H, J et K). La divergence des nucléotides entre les sous-types du VIH-1 est de 25 à 30% au niveau du gène *env* alors que dans le gène *pol* (la partie la plus conservée du génome des rétrovirus), elle est d'environ 9-11% (**Santos and Soares, 2010**).

L'apparition de discordance dans l'analyse phylogénétique entre le gène *env* et *gag* suggèrent la présence de formes recombinantes. Les premiers cas de recombinaison identifiés concernés le sous-type E qui formait un cluster unique particulier dans l'analyse du gène *env* alors que sur l'analyse du gène *gag* il se regroupait dans le cluster du sous-type A. Ainsi le sous-type E « pur » était le résultat d'un événement de recombinaison entre le sous-type A d'une région *gag* et de la région *env* d'une autre souche (**McCutchan et al., 1996**). Cette virus recombinant a été donc renommé CRF01_AE du nom des sous-types qui le composent. Cependant, il aurait été suggère que ce CRF01_AE ne soit pas une forme recombinant, mais plutôt un sous-sous-type du clade A dont la région *env* aurait muté plus rapidement que la région *gag* ou *pol* (**Anderson et al., 2000**). D'autres cas de formes recombinantes ont été décrites comme le sous-type G qui est classé A en *env* et G en *gag* (**Carr et al., 1998; McCutchan et al., 1999; Santos et al., 2006**). Le sous-type I « pur » a été identifié comme étant un recombinant complexe impliquant entre les sous-types A, G et I (**Nasioulas et al., 1999**)

Les isolats de recombinants inter-sous-types sont divisés en deux catégories distincts : ceux qui sont retrouvés dans une population avec au moins trois personnes sans lien épidémiologique présentant les mêmes points de recombinaison inter-sous-typique sont appelés formes recombinantes circulantes (ou CRFs). A l'inverse, ceux qui ont été isolés chez moins de trois personnes sont appelés formes recombinantes uniques (ou URFs). Par conséquent, ces formes recombinantes ne constituent pas les grandes épidémies ; elles sont plutôt le sous-produit de brassage de multiples sous-types/CRF circulant dans une région donnée (**Janssens et al., 1997**).

3.3. Répartition des sous types et formes recombinantes dans le monde

La distribution des sous-types du VIH-1 dans le monde est très hétérogène avec une prévalence régionale de variants spécifiques (figure 13) (**Janssens et al., 1997**). La forme la plus répandue de VIH-1 est le sous-type C qui en 2004 a été responsable d'environ 50% des infections mondiales (**Hemelaar et al., 2006**). Il est prévalent dans les pays de l'Afrique Australe (avec 2/3 des cas de VIH dans le monde), de l'Afrique de l'Est, dans la région Sud du Brésil, en Inde (zone de forte densité de population) et dans les pays avoisinants. Le sous-type A est très répandu en Europe centrale, en Afrique, en Iran et Europe de l'Est et en Asie centrale. C'est le sous-sous-type A1 qui la forme la plus répandue, alors que les sous-sous-types A2 et A3 se trouvent principalement en Afrique et rarement en Europe. Le sous-type B est le variant qui a le plus diffusé, il prédomine dans les pays développés tels que les Etats-Unies, les pays de l'Europe occidentale, le Japon et l'Australie. Les six autres sous-types du VIH-1 (D, F, G, H, J et K) sont relativement peu représentés avec seulement 10% des nouvelles infections en 2004 (**Hemelaar et al., 2006**).

Certains CRFs ont un grand impact sur les épidémies locales du VIH/SIDA tels que le CRF01_AE en Asie du Sud et le CRF02_AG en Afrique de l'Ouest. Le CRF06_cpx est la deuxième forme recombinante circulante en Afrique de l'Ouest en termes de prévalence alors que les autres CRFs ont une implication beaucoup plus faible (**Ramirez et al., 2008**). Des recombinants diverses impliquant ces CRF ont été également décrits, bien qu'en de faibles proportions. En Afrique de l'Ouest, c'est le cas du CRF02_AG/CRF06_cpx au Niger (**Mamadou et al., 2003**) et du CRF02_AG/CRF09_cpx en Côte d'Ivoire (**Toni et al., 2005**).

En définitive, l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 est un processus dynamique dans le temps. Pour exemple, le sous-type C qui ne serait entré au Brésil qu'au milieu des années 1980 (**Santos AF et al., 2007 ; Salemi M et al., 2005 ; Bello G et al., 2008**) représente de nos jours 50% des nouvelles infections dans la région du Sud du Brésil et 5-30% dans les pays voisins (**Soares EA et al., 2005 ; Locatelli D et al., 2007**). De même, dans la partie Australe et Orientale de l'Afrique, le sous-type C surclasse tous les autres sous-types pratiquement en extinction, tels que les sous-types B et D, qui étaient largement représentés dans cette région dans les années 1980 (**Williamson C et al., 1995 ; Jacobs GB et al., 2009**).

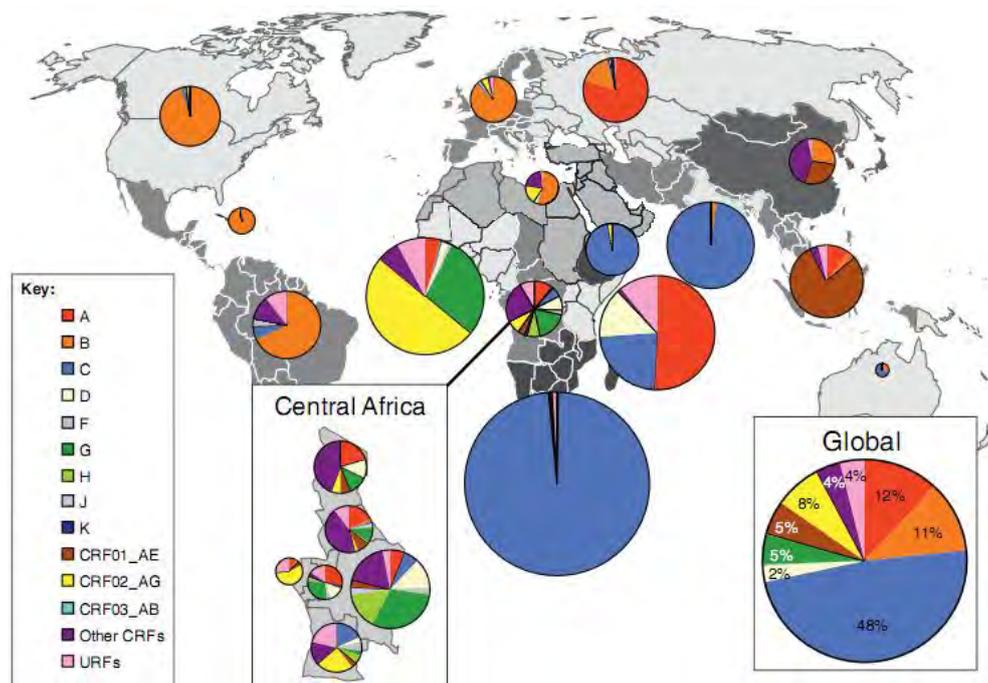


Figure 13 : Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1.

Le camembert avec les pourcentages, représente les proportions relatives de chacun des sous-types/CRF du VIH-1 groupe M identifiés à travers le monde (Hemelaar, 2012).

3.4. Impact de la diversité génétique sur le diagnostic et le monitoring

La diversité génétique constitue un grave problème de santé publique et les incidences de la diversité génétique du VIH vont avoir un impact sur tous les aspects de la prise en charge de l'infection. Elles sont perceptibles sur le diagnostic, la quantification de la charge virale, la transmission et la progression de la maladie, la réponse au traitement antirétroviral et le développement de vaccins.

3.4.1. Impact de la diversité génétique sur le diagnostic

La majorité des tests sérologiques du VIH vise les anticorps anti-VIH. A l'origine, ces tests utilisaient seulement les épitopes du sous-type B. Lorsque le groupe O du VIH a émergé au début des années 1990, il s'est révélé négatif sur beaucoup de tests approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et ces tests ont été conçus sur la base du sous type B (Gaschen *et al.*, 2002). Cet échec a conduit à l'évaluation systématique des tests approuvés par la FDA parce que ces tests avaient une réactivité sur un large spectre des sous-types du groupe M du VIH-1.

Si la diversité génétique du VIH a eu un impact minime sur le diagnostic sérologique, du fait de la conservation des acides aminés des épitopes immunodominants au

niveau des protéines structurales, le challenge est beaucoup plus importants pour les tests de diagnostic moléculaire (**Butler et al., 2007; Parry et al., 2003**). Ainsi plusieurs amorces génériques permettant d'identifier tous les sous types du VIH-1 ont été conçues comme des outils de détection et de confirmation des infections VIH et à SIVcpz à travers le monde (**Yang et al., 1999**). Ces amorces permettent non seulement d'identifier tous les sous types du VIH mais aussi de réaliser des analyses phylogéniques pour identifier les sous types dans les études d'épidémiologie moléculaire (**Yang et al., 2000a; Yang et al., 2000b**).

3.4.2. Impact de la diversité sur le monitoring virologique

L'utilisation de la charge virale comme marqueur de la progression de la maladie et de l'efficacité du traitement antirétroviral est importante dans le management clinique de l'infection à VIH (**Holguin, 2004; van den Berk et al., 2003**). Il existe plusieurs méthodes de détermination de la charge virale. La RT-PCR dépendant des amorces spécifiques, il a été noté dans les premiers tests conçus sur la base du sous-type B, n'ont pas souvent parvenus à détecter correctement les sous-types non-B, en particulier A, F et CRF01_AE (**Mellors et al., 1997**). L'ajout d'amorces spécifiques des sous-types AG, a considérablement amélioré la fiabilité des tests de RT-PCR (**Chew et al., 1999; Debyser et al., 1998; Nolte et al., 1998; Parekh et al., 1999**). Les capacités de ces tests à quantifier la charge virale plasmatique de l'infection due à un sous type non B continuent de faire l'objet de nombreuses études et beaucoup de progrès ont été faits pour améliorer la sensibilité de ces tests de manière à quantifier tous les sous types du VIH-1, aussi bien sur le plasma que sur des spots de sang séchés (**Berger et al., 2005; Bourlet et al., 2011; Choi et al., 2009; Garrido et al., 2009; Rouet et al., 2010**). La technologie Abbott RealTime HIV-1 et la nouvelle version de Cobas Taqman sont les tests disponibles à ce jour, pouvant détecter efficacement les souches du groupe O et P (**Church et al., 2011; Sire et al., 2011; Sizmann et al., 2010; Swanson et al., 2007**) alors que la technologie Nuclisens EasyQ arrive à quantifier le VIH-2 groupe A (**Rodes et al., 2007**).

3.4.3. Impact de la diversité génétique sur le traitement :

L'impact de la diversité génétique sur la réponse au traitement est une question cruciale car les molécules ARV ont été mises au point sur la base des souches B alors que plus de 80% des cas de VIH sont dus à des sous types non B.

Tant la résistance naturelle des différents virus chez les personnes naïves de traitement ainsi que la propension des virus pour le développement de la résistance aux ARV après le traitement sont des préoccupations majeures (**Loemba et al., 2002; Ruelle et al., 2004**). Mais malgré les variabilités génétiques claires entre les différents sous types, que ce soit en pré ou en post-traitement peu de différences cliniquement significatives de la réponse au traitement ont été répertoriés entre les sous-types (**Adje et al., 2001**). Beaucoup d'autres facteurs, notamment la disponibilité du traitement ARV et l'observance peuvent jouer un rôle important dans les différentes formes de résistance entre les sous-types non-B répandues dans le monde et le sous type B endémique dans les pays les plus développés (**Apetrei et al., 1998**).

3.4.4. Impact de la diversité génétique sur la recherche vaccinale :

La diversité génétique a des conséquences importantes sur la santé publique et clinique et reste également l'un des obstacles majeurs à la découverte d'un vaccin préventif efficace. Depuis plus de 30 ans, toutes les stratégies sont tentées et, jusque là, tous les candidats vaccins qui ont réussi à stimuler la production de titres élevés anticorps neutralisants ont échoué par rapport à la protection contre l'infection. Le VIH induit relativement peu d'anticorps neutralisants (**Kaleebu et al., 2002**), Mais la recherche sur les anticorps a repris et des études ont montré la place importante des Ac neutralisants dans la réponse immunitaire (**Blish et al., 2008; Scheid et al., 2009**).

L'espoir est aussi entrain de renaître depuis la découverte de 3 anticorps (dont 2 qui sont des variants somatiques : VRC01 et VRC02) capables de neutraliser in vitro plus de 90% des souches de VIH-1 circulants (**Wu et al., 2010**). Cette découverte représente ainsi un espoir réel pour le vaccin car il s'affranchit de la diversité génétique en sélectionnant des sites d'immunisation conservés d'une souche virale à l'autre (**Zhou et al., 2010**). Enfin, d'autres pistes de recherche plus récentes ont été décrites avec l'étude sur la prophylaxie près exposition, dénommée PrEP (**Karim et al., 2011; Ruffin et al., 2012**). .

4. Les outils de diagnostic et de monitoring biologique du VIH

4.1. Les techniques de diagnostic de l'infection à VIH/SIDA

Deux types de techniques sont utilisés : les techniques indirectes permettent la détection des anticorps et les techniques directes permettent la mise en évidence des virus (par culture), des protéines virales (Ag p24) et du génome viral (ARN plasmatique ou ADN proviral).

Chez l'adulte, le diagnostic de l'infection à VIH repose essentiellement sur la mise en évidence des anticorps par sérologie sauf dans le cas d'infection par un variant non détectable par les troussees disponibles et dans le cas primo-infection (ARN viral, Ag p24). Et chez les nouveaux nés, le diagnostic de l'infection se fait par l'utilisation des techniques directes (ARN plasmatique ou ADN proviral).

4.1.1. Les techniques moléculaires de diagnostic

✓ La technologie Amplicor ADN VIH-1 (roche)

Le test Amplicor HIV-1 ADN test[®], version 1.5 est basé sur l'amplification par PCR d'une séquence de 155 pb du gène *gag* suivie d'une détection par hybridation de sondes spécifiques en présence d'un contrôle interne. Tout d'abord, une étape de préparation des échantillons est réalisée en présence de détergent suivie de l'extraction de l'ADN viral à chaud. Après l'amplification par PCR, une détection de l'ADN viral et du contrôle interne est réalisée séparément après une dénaturation chimique. La fixation d'un conjugué marqué à l'Avidine peroxydase permet la lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 450nm

✓ la technologie de Roche Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qual

Le test Roche[®] CAP/CTM HIV-1 Qual est un test qualitatif consistant à la détection simultanée de l'ADN du VIH-1 et du contrôle interne (CI). Le test cible une région hautement conservée du gène *gag* P24 du VIH-1. Ce test combine l'extraction automatisée l'ADN à une étape d'amplification-détection sur un système entièrement intégré.

✓ La technologie Abbott RealTime HIV-1[®] (Abbott), des laboratoires Abbott
Abbott RealTime HIV-1 Qualitative est un dosage in vitro par amplification d'acides nucléiques du HIV-1 (ARN ou ADN). C'est une technique qui est entièrement automatisée et amplifie la région pol/intégrase et la détection se fait à l'aide de sonde marquée partiellement double brin.

✓ **La technologie de NucliSens EasyQ HIV v1.1®**

La technologie de NucliSens EasyQ HIV v1.1® des laboratoires Biomérieux permet la quantification de l'ARN viral par amplification-détection d'une séquence cible du gène *gag* selon les instructions du fabricant (BioMérieux, Lyon, France). L'extraction utilise le principe de la technique de Boom grâce à de particules de silice magnétique ajoutées au lysat. Une amplification de type NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) de l'ARN viral et du contrôle interne se feront simultanément avant la détection en temps réel à l'aide de balises moléculaires.

✓ **La technologie BIOCENTRIC**

Le kit générique HIV-1 quali (BIOCENTRIC, Brandol, France) réalise une amplification par RT-PCR ciblant les régions *gag* et LTR du génome du HIV et détection se fait grâce à une sonde de type Taqman. Cette technique détecte les groupes M, O et plusieurs CRFs. L'extraction se fait de façon manuel avec le Qiagen spin column (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) et l'amplification se fait grâce à l'automate PRISM 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA).

4.2. Les outils de monitoring biologique du VIH

Pour les patients avec des tests de diagnostic positif, le monitoring biologique se fait avec un bilan regroupant des tests sérologique, hématologie, biochimique, immunologique et virologique. Pour ce dernier, il utilise la quantification de la charge virale et les tests de résistances développés.

4.2.1. Les techniques de suivi virologique

Le test de charge virale constitue la méthode de référence pour le suivi des patients vivant avec le VIH sous traitement ARV. Elle permet de mesurer la réplication virale et de prédire l'évolution de l'infection. La quantification de la charge virale est devenue une recommandation forte de l'OMS pour le monitoring des patients vivant avec le VIH.

Les technologies de charge virale peuvent être divisées en techniques basées sur les acides nucléiques (qui détectent et amplifient les acides nucléiques) et en techniques non basées sur les acides nucléiques qui détectent et quantifient les protéines et enzymes virales. Mais dans le contexte des pays à ressources limitées,

ce sont les technologies de charge virale basées sur l'amplification des acides nucléiques qui sont les plus utilisées.

Les plateformes Abbott Real time, NucliSens HIV EasyQ, COBAS TaqMan et BIOCENTRIC ont été présentées dans la partie diagnostique précoce. Les autres plateformes de charge virales disponibles sont :

- ✓ **VERSANT™ kPCR Molecular System** (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.)

Le test Versant HIV de Siemens est une technique entièrement automatisée. L'extraction utilise des billes magnétiques après une étape de lyse avec la protéinase K et un tampon chaotric. L'amplification est une RT-PCR ciblant la région pol et la détection se fait par des sondes de type TaqMan. Le test Versant HIV de Siemens utilise la technologie "one-room" et détecte les VIH-1 groupe M, O et les CRFs.

- ✓ **The artus™ HIV-1 RG/QS-RGQ RT-PCR System** (QIAGEN N.V.)

Le test Artus de QIAGEN utilise une amplification par RT-PCR en temps réel ciblant la région LTR. L'extraction peut être automatisée grâce à la plateforme d'extraction automatique : le système QIASymphony™ SP/AS. L'extraction peut également être manuelle avec l'automate : le système QIAamp® DSP Virus Kit

4.2.2. Implantation et décentralisation des plateformes de charge virale

En 2013, l'OMS a recommandé l'utilisation de la charge virale comme la méthode de référence pour le monitoring et la confirmation de l'échec aux TARV. Mais, il y a de nombreux défis à la mise en place et la décentralisation de la charge virale dans le contexte de pays à ressources. Le document sur les considérations techniques et opérationnelles pour l'implantation de la charge virale de l'OMS fournit des conseils sur la mise en œuvre et la décentralisation de la charge virale pour les programmes, les ministères de la santé et les partenaires techniques et financiers en utilisant une approche en trois phases : la planification, la mise à l'échelle ou décentralisation et la pérennisation. Cette publication est destinée à servir de point de référence pour les pays qu'ils soient débutant à la mise en œuvre ou à la mise à l'échelle.

Phase 1: la planification

La planification est la clé de l'implantation et la décentralisation des tests de charge virale pour les programmes nationaux la lutte contre le VIH. La planification repose sur les points suivant :

- **L'engagement des politiques et gouvernements** : L'accès universel des tests de charge virale pour tous les patients sous TARV nécessite une planification rigoureuse, avec la contribution de tous les acteurs concernés, un calendrier réaliste, mais robuste et des stratégies de placement et la diffusion des nouvelles technologies à l'échelle nationale. Les gouvernements nationaux sont les mieux placés pour réunir les parties prenantes, d'organiser la réponse et de diriger des groupes de travail dédiés à l'élaboration et la mise en œuvre des programmes pour le monitoring de la charge virale.
- **L'harmonisation** : Elle est essentielle au niveau national pour optimiser à la fois la mise en œuvre des programmes et de la gestion des laboratoires. D'un point de vue programmatique, les normes de prestation de services dans les installations devraient être clairement établies et intégrées à tous les niveaux de la gestion du programme. Il est également important pour les responsables des programmes nationaux de maintenir ouvertes les voies de communication et les opportunités pour l'examen du programme. De même, le rôle du laboratoire de référence central ou national sera également d'établir des normes pour la gestion des laboratoires, la formation du personnel, l'assurance de la qualité et la correction des dosages, la documentation et les rapports qui peuvent ensuite être traduits à des opérations au niveau du laboratoire régional.
- **Le développement d'un algorithme clinique pour le suivi par la charge virale** : Réviser l'algorithme national de surveillance du TARV est une pierre angulaire dans la planification et la décentralisation des tests de charge virale, car il influe considérablement sur de nombreuses décisions ultérieures, notamment le nombre de tests et leurs coûts pour les programmes. Les gestionnaires des programmes doivent collaborer étroitement avec les cliniciens, les dispensateurs des TARV et le laboratoire pour déterminer si des modifications sont nécessaires pour adapter au mieux à l'épidémie nationale.
- **La cartographie et la prévision d'un réseau pour les plateformes de charge virale** : la phase de planification devrait inclure la cartographie des besoins en matière de tests de charge virale, l'évaluation des ressources existantes et la nécessité de renforcement des équipements. Les programmes devraient veiller à ce que les algorithmes cliniques pour les tests de charge

virale ne dépassent pas les capacités existantes pour fournir les meilleurs soins.

- **L'évaluation des besoins en charge virale** : les données sur les capacités de réalisation des tests de charge virale et les informations sur les systèmes existants pour appuyer la réalisation de la charge virale (diagnostic précoce et CD4) doivent être pris en compte lors de l'évaluation.
- **Le coût des tests de charge virale** : le prix pour un test de charge virale peut varier (10 \$ - 60 \$) selon le fabricant et/ou le pays. Récemment, plusieurs fabricants se sont engagés à des accords régionaux en ce qui a la réduction des tarifs pour les réactifs de charge virale (environ 10,50 \$ US). Un plan d'approvisionnement pour les marchés avec des commandes groupées pour les réactifs et les consommables sur une base trimestrielle devrait également être envisagé même si une commande annuelle est souhaitée. Il convient donc de prévoir des livraisons échelonnées en compte tenu des courtes dates de péremption des réactifs et les obligations liées à leur conservation.
- **Type d'échantillon et la sélection de produits** : la sélection des produits devrait tenir compte de la performance ainsi que les caractéristiques opérationnelles pour veiller à ce que les produits et les échantillons soient adaptés. Les caractéristiques de chaque type d'échantillon doit être pris en compte selon les réseaux de transport existant, les infrastructures et les plateformes de charge virale disponibles. Certains programmes combinent différents types de prélèvements et plateformes pour être optimal et pour mieux répondre à différents paramètres. Chaque type de plateforme et de prélèvement doit être validé pour assurer des résultats de qualité.
- **Les caractéristiques des différentes plateformes de charge virale** : Bien que les spécifications techniques des plateformes de charge virale soient disponibles, mais des conseils pratiques doivent être pris au moment de choisir les plateformes de la charge virale. Les technologies actuelles diffèrent en termes de principe, du débit, du coût, des infrastructures, des ressources humaines nécessaires et la capacité à utiliser les DBS.
- **L'acquisition de matériel** : Il existe trois méthodes courantes de l'acquisition de matériel de laboratoire : l'achat, la location et location à bail. La méthode

dicte le type de contrat de maintenance, le coût et les différentes conditions de paiement.

Phase 2 : Mise à l'échelle ou décentralisation des plateformes de charge virale

La décentralisation des plateformes de charge virale est recommandée pour assurer un succès du monitoring. Cette approche permet de éviter le déplacement des prélèvements, du personnel de laboratoire ou clinique et permet une collecte et une gestion optimale des données programmatiques et opérationnelles sur le plan nationale.

- **La suppression progressive de la routine pour la charge virale** : les pays devraient élaborer des stratégies détaillées, spécifiques et chaque pays devra faire la transition systématiquement de la surveillance de routine à la surveillance par la charge virale pour tous les patients sous TARV. L'approche peut être appliquée progressivement en fonction de plusieurs facteurs (tels que la répartition géographique et la capacité existante) en mettant l'accent sur les populations prioritaires ou une combinaison. La planification de la phase de décentralisation doit inclure une prévision rigoureuse des coûts et du financement des analyses. Si les pays décident d'éliminer les CD4 en même temps que la décentralisation de la charge virale pour les personnes sous TARV, le budget pour la CD4 doit être redéployé pour les tests de CV.
- **Les ressources humaines** : Pour la gestion efficace de la mise à échelle, il faut investir dans les ressources humaines pour assurer la qualité des soins. Une cartographie de la capacité des ressources humaines existantes pour chaque type de travail est fortement encouragée. La formation, le mentorat et la surveillance sont nécessaires et doit être réalisées par un personnel de laboratoire expérimenté pour coordonner et superviser la mise en œuvre et la décentralisation des tests de charge virale.
- **La formation et la supervision** : l'élargissement du test de la charge virale représente un changement de paradigme dans la surveillance TARV pour de nombreux pays, des plans de formation et de communication détaillées sont nécessaires pour assurer la diffusion d'informations précises à toutes les parties prenantes. Des plans de formation pour chaque type de travailleur

devrait inclure un curriculum de la formation, la rotation du personnel et un recyclage des compétences.

- **Système de management de la qualité** : le maintien de la qualité des résultats de charge virale dans la mise à échelle exige le renforcement des systèmes d'assurance qualité et le réseau des plateformes de charge virale. Chaque pays doit avoir un système de management de la qualité et un plan d'assurance qualité externe pour s'assurer que tous les tests sont disponibles, exacts et opportuns. Un système de gestion de la qualité comprend un cycle continu de monitoring, d'évaluation et d'amélioration de la qualité du processus à tous les niveaux du programme.

Pour veiller à ce que le réseau de charge virale soit renforcé et intégré dans le cadre du système global de santé, le système de gestion de la qualité devrait concentrer ses efforts sur l'obtention d'accréditation internationale pour les laboratoires d'analyses biomédicales. Ainsi, une approche par étapes en utilisant les normes internationalement reconnues (SLMTA, SLIPTA ou équivalent) doit être mise en œuvre pour encourager et soutenir la mise en œuvre d'un système de gestion de la qualité dans les laboratoires.

PHASE 3: Pérennisation - maintien un réseau de test de charge virale

- **L'harmonisation entre les partenaires et les partenaires d'exécution** : La mise en œuvre d'un programme national de charge virale de qualité nécessite la coordination entre toutes les parties prenantes (bailleurs de fonds et les partenaires d'exécution) pour fournir un appui pour la prestation de services liés au VIH. Il est important d'harmoniser la réalisation de la charge virale, le report et le monitoring au niveau national.
- **Les systèmes de suivi, dévaluation et d'information** : La centralisation du suivi et de l'évaluation constitue un élément clé pour s'informer de l'expansion et la maintenance des plateformes de charge virale. Le ministère de la santé devrait recueillir et analyser des données sur l'efficacité du programme et la performance dans le cadre d'un plan de suivi et d'évaluation plus large. Ces données doivent être présentées et partagées avec toutes les parties prenantes. Les formulaires de demande de charge virale représentent une opportunité pour la collecte de données sur les éléments clés du programme de test de charge virale nationale. Les formulaires peuvent être utilisés pour

surveiller les progrès dans l'implantation de la charge virale et la qualité de la prestation de services cliniques. Les formulaires de demande de charge virale et les rapports doivent être simples, claires et succinctes pour s'assurer qu'ils soient remplis avec précision et rapidité.

- **La collecte et l'analyse des données** : La collecte de données et le contrôle continu sont nécessaires pour informer les gestionnaires de programme du volume et de la qualité des services de la charge virale implantés et prévus. Des examens trimestriels ou semestriels avec les parties prenantes peuvent être organisés pour corriger et rendre compte des résultats aux partenaires. Les données recueillies et les enseignements tirés sont des informations importantes pour les décideurs et les bailleurs de fonds.
- **Les recherches opérationnelles en cours** : Les pays devraient envisager d'autres domaines de recherche opérationnelle pour améliorer le réseau de test de charge virale. Et d'autres questions actualités qui tournent autour du coût, de l'impact et la durabilité des tests de charge virale, l'impact et les résultats pour les populations prioritaires, la non-observance, la transmission et acquisition de résistances aux ARV.

4.3. L'étude de la diversité génétique

Les techniques moléculaires sont essentiellement basées sur la méthode de la PCR et le principe de base repose sur une amplification génique d'un ou de plusieurs gènes à partir d'ADN ou d'ARN viral après une étape de rétrotranscription.

- **Séquençage et phylogénie moléculaire**

Le séquençage est la méthode la plus précise et fiable pour identifier les variants du VIH-1. La méthode de séquençage la plus utilisée actuellement, est celle de Sanger réalisée avec des didéoxynucléotides ou terminateurs de chaîne (**Sanger et al., 1977**). Après la PCR, les séquences obtenues (génomme complet ou partiel) sont analysées par phylogénie pour déterminer leurs liens avec des séquences antérieurement caractérisées et disponibles dans les bases de données (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Plusieurs méthodes phylogénétiques sont utilisées pour l'analyse des séquences : la méthode du plus proche voisin (Neighbor Joining)(**Saitou and Nei, 1987**), la méthode du

maximum de vraisemblance (Maximun Likelihood) (**Felsenstein, 1981**) et l'analyse des recombinaisons (Rip, Blast subtyping et le bootscanning (**Salminen et al., 1995**).

- **Multi-region Hybridization Assay (MHA)**

C'est une technique qui permet de caractériser les sous-types, recombinants et les doubles infections par amplification de plusieurs régions du génome (**Hoelscher et al., 2002**). La technologie utilise le principe de la PCR en temps réel avec des sondes spécifiques. Cette a été utiliser pour l'identification de huit variants communs entre l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Elle a aussi démontré la capacité de cette technique de mettre en évidence les doubles infections et par conséquent, elle peut être utilisée c5omme outil de surveillance de la variabilité génétique et le suivi des doubles infections dans les pays africains (**Vidal et al., 2013**).

- **Single Genom Amplification (SGA)**

Il a été démontré que les techniques de PCR et de séquençage classiques ne détectent que les variants majoritaires, supérieurs à 20% de la population virale chez un individu infecté (**Gunthard et al., 1998**). Cependant, certains aspects de la recherche nécessitent la mise en place d'une nouvelle technique pour l'amplification des variants minoritaires (**Johnson et al., 2008**). Le SGA initialement appelé SGS (Single Genom Sequencing) a été utilisé pour démontrer les limites des techniques de la PCR classique et de séquençage dans l'étude de la diversité génétique et la détection des mutations associées à la résistance aux antirétroviraux (ARV). Le SGA permet de détecter 10% des mutations de résistance en plus de celles détectées par la technique de séquençage classique. Le SGA est aussi utilisé dans l'analyse moléculaire de la transmission du VIH-1 et son évolution dans les populations clés. Ces résultats qui ont été obtenus en appliquant le SGA sur le gène *env*, montrent aussi sa faisabilité sur d'autres gènes du génome viral en entier (**Salazar-Gonzalez et al., 2008**).

- **Le séquençage à haut débit**

C'est en 2007 qu'est apparue sur le marché la première génération des appareils de séquençage à haut débit. Globalement leurs technologies sont assez proches et fonctionnent en 3 étapes. La première consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser. La seconde permet l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer. Enfin la dernière étape comprend la lecture de la séquence proprement dite. Trois technologies sont apparues de façon quasi

simultanée : le pyroséquençage, le séquençage avec des terminateurs réversibles et le séquençage par ligation et leurs caractéristiques sont décrites ci-dessous.

- **Pyroséquençage (Roche)**

Avec cette méthode, l'ADN subit après fragmentation une étape d'amplification par PCR. Cette PCR est réalisée en émulsion, ce qui permet d'effectuer plusieurs millions de réactions indépendantes dans un seul tube. Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une plaque où chaque emplacement ne peut contenir qu'une seule molécule d'ADN amplifiée. La réaction de séquençage par synthèse est alors initiée base par base. La lecture de chaque base incorporée est révélée à l'aide d'une réaction chemoluminescente et détectée par une caméra CCD.

Les erreurs de séquences détectées sont majoritairement des insertions/délétions dues aux régions homopolymères (répétitions identiques de la même base).

- **Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina)**

Pour cette technique, l'amplification de l'échantillon à analyser ne s'effectue pas en solution mais sur un support où l'ADN a été amplifié. Elle se déroule position après position en ajoutant un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Une lecture laser permet alors de détecter simultanément toutes les positions incorporées. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle.

Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre.

- **Séquençage par ligation (Applied Biosystems)**

La première étape d'amplification de la méthode de séquençage d'Applied Biosystems est identique à celle du pyroséquençage. Par contre, les séquences amplifiées sont fixées sur un support solide au lieu d'une plaque. La réaction de séquençage s'effectue ensuite par un système assez complexe de cycles de ligation et de clivage. Cette technique va permettre non seulement la lecture de la séquence mais inclut un système de correction des erreurs d'incorporations.

Le système incorporé de correction d'erreurs associé à l'utilisation de la ligase rend cette technologie très fiable.

CHAPITRE 2: GÉNÉRALITÉ SUR LE VHC

CHAPITRE 2 : GENERALITE SUR LE VHC

1. Histoire de l'infection à VHC

1.1. Découverte du Virus de l'Hépatite C (VHC)

Dans les années 70, en développant des tests sérologiques pour la détection des virus de l'hépatite A ou B (VHA ou VHB) chez les patients atteints d'Hépatite, Feinstone et collaborateurs observèrent que certains patients étaient séronégatifs pour le virus de l'hépatite A et B. Ils en déduisirent l'existence d'un agent inconnu pouvant causer des hépatites non A non B (NANBH) (**Feinstone et al., 1975**).

En 1978, Alter et son équipe réussirent à infecter des chimpanzés à partir des sérums de patients ayant une hépatite NANBH (**Alter et al., 1978**). Mais aucune technique classique ne permis l'isolement d'antigènes, ou de particules infectieuses.

Dix ans plus tard, Choo et al. produisirent une banque d'expression d'ADNc, à partir du sérum de ces chimpanzés infectés, puis criblèrent cette banque avec des sérums de patients atteints de NANBH (**Choo et al., 1989**). Ce procédé a permis d'identifier les caractéristiques moléculaires de l'agent causal des NANBH, que nous appelons aujourd'hui le virus de l'Hépatite C. Cette découverte permis de mettre au point un dépistage ELISA, mettant ainsi fin à la première cause de transmission du VHC, à savoir, la transfusion sanguine.

1.2. Classification du VHC

Le virus de l'Hépatite C est classé dans la famille des *Flaviviridae*. Cette famille est constituée de trois genres : le genre *Flavivirus* (virus de la fièvre jaune, virus de la Dengue, West Nile virus), le genre *Pestivirus* (virus de la peste porcine, virus de la diarrhée bovine) (**Miller and Purcell, 1990**) et le genre *Hepacivirus* (VHC, GB virus A, B et C) (**Robertson et al., 1998**). C'est un virus au tropisme restreint, puisqu'il infecte principalement les hépatocytes, mais peut également être retrouvé dans les cellules dendritiques et les cellules mononuclées sanguines (**Navas et al., 2002; Okuda et al., 1999**). Le VHC est réparti en 6 génotypes (1 à 6) et en plusieurs sous types. Les génotypes diffèrent entre eux de 30% à 35% au niveau de leurs séquences nucléotidiques (**Simmonds, 2004**). Dans un même génotype on distingue différents sous types (désignés par des lettres) présentant un taux de variation de 20% en moyenne (**Simmonds, 2004**). Chez un même individu on retrouve également une grande hétérogénéité génétique se traduisant par l'existence de quasi espèces (**Martell et al., 1992**).

2. Biologie du VHC

2.1. Structure et organisation génomique

2.1.1. Structure du VHC

Le VHC est un virus enveloppé sphérique de 55-65 nm de diamètre (**Kaito *et al.*, 1994**). Il est constitué d'une nucléocapside de 30-35 nm de diamètre (**Andre *et al.*, 2002**) et entouré d'une enveloppe dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Le VHC est un virus à ARN simple brin positif et non segmenté contenu dans une capsidie protéique icosaédrique. L'isolement de virions et leur observation en microscopie électronique se sont avérés très difficiles du fait des faibles titres viraux dans les échantillons biologiques et de leur association avec les lipoprotéines.

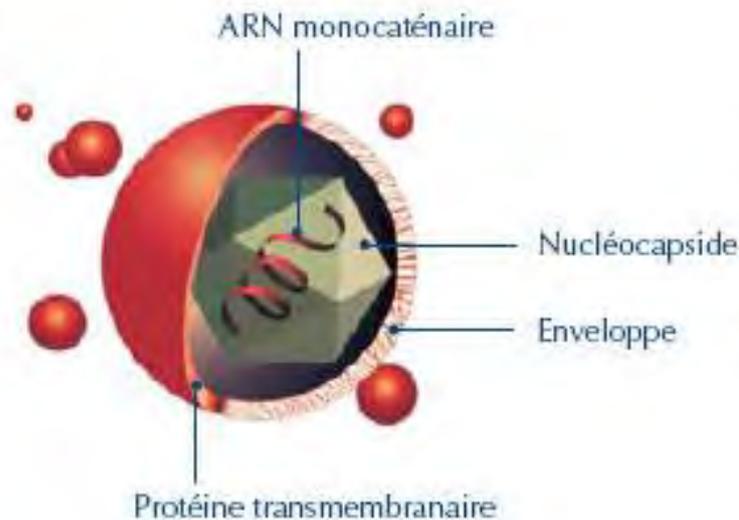


Figure 14 : structure du VHC (https://www.ccr.fr/sites/hepatite_C/site/maladie.htm du 16 Novembre 2015)

2.1.2. Le génome du VHC

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9,6kb (**Choo *et al.*, 1989**) avec un cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de région non traduite 5' et 3' (Figure 15). Une des caractéristiques intéressantes du génome du VHC est son degré élevé de variabilité génétique. Cependant les taux de mutation diffèrent en fonction des régions génomiques. Les régions E1 et E2 sont les régions les plus variables, alors que les extrémités 5' et 3' NTR sont très conservées parmi les génotypes.

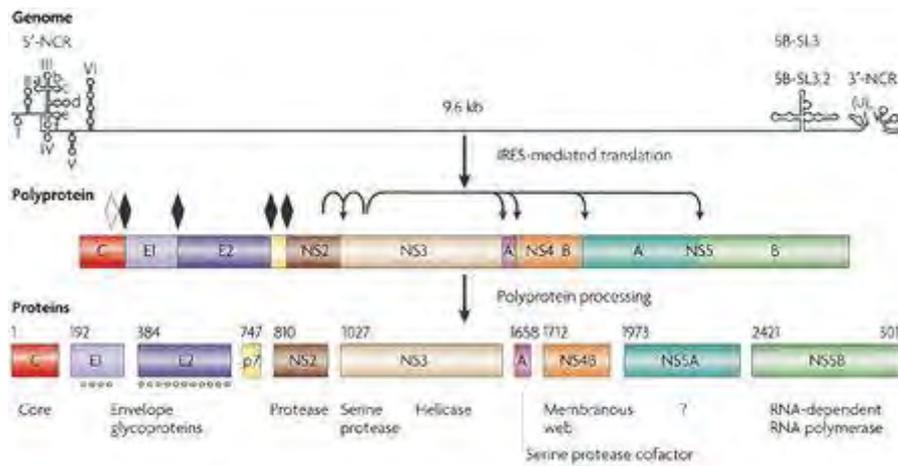


Figure 15 : Génome du virus de l'hépatite C (**Moradpour et al., 2007**)

2.1.2.1. Régions non codantes

- **La région 5' non traduite (5'NTR)**

La 5'NTR assure la traduction de l'ORF en une polyprotéine de 3010 aa. C'est une région de 341 nucléotides, très conservée et très structurée. La 5'NTR forme une structure secondaire comprenant quatre grands domaines structuraux distincts, I à IV. Les domaines II à IV ainsi que le début de la séquence ORF constituent le site interne d'entrée du ribosome (IRES) (Figure15).

Par analogie avec d'autre virus à ARN utilisant un IRES, il a été suggéré que la région 5'NTR ne contient pas seulement les facteurs déterminants pour la traduction, mais aussi des éléments pour la réplication de l'ARN (**Astier-Gin et al., 2005**). En effet, il semblerait que : (1) la séquence en amont de l'IRES est essentielle pour la réplication de l'ARN viral (**Friebe et al., 2001**), (2) des séquences dans l'IRES sont nécessaire à la réplication efficace du VHC (**Friebe et al., 2001**) et (3) la tige-boucle du domaine II de l'IRES est cruciale pour la réplication (**Appel and Bartenschlager, 2006**).

Des études ont révélées qu'un micro-ARN (miR-122), spécifiquement exprimé dans les hépatocytes, facilite la réplication de l'ARN du VHC en interagissant avec la région 5'NTR en culture cellulaire (**Jopling et al., 2005**). Cet effet n'a toutefois pas été confirmé in vivo (**Sarasin-Filipowicz et al., 2009**).

- **La région 3' non traduite (3'NTR)**

La région 3'NTR, de taille variable selon les génotypes, contient trois domaines distincts : une région peu conservée de 40 à 250 nucléotides, une séquence interne

poly-uracile/pyrimidine (poly(U/UC)) de longueur variable (20 à 200 nucléotides) et une séquence de 98 nucléotides, appelée la région X. Cette région très conservée et très structurée, comprenant trois tiges boucles stables SL1, 2 et 3, joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin ARN (-) au cours de la réplication (Figure 10) (**Kolykhalov et al., 1996**).

Il existe aussi en amont de la région 3'NTR, dans la séquence codant la protéine NS5B, une structure tige boucle, appelé 5BSL3.2, qui interagit avec la boucle SL2 de la région 3'NTR (Figure 10). Cette interaction est essentielle à la réplication de l'ARN virale (**Friebe et al., 2005; You et al., 2004**).

2.1.2.2. Les protéines virales

Le génome du VHC code une polyprotéine de 3010 aa, synthétisée au niveau du RE et maturée en 10 protéines ancrées ou apposées à la membrane du RE (Figure 15). Ces protéines sont classées en deux groupes, les protéines structurales core, E1, E2 forment les particules virales et les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B sont impliquées dans la maturation, la réplication et l'assemblage des virions. La protéine p7 est une viroporine jouant un rôle dans l'infectivité du virus (**Steinmann et al., 2007**). De plus, il a été décrit qu'un cadre de lecture chevauchant celui de la polyprotéine au niveau de la séquence de la protéine core code une onzième protéine, la protéine ARFP.

- **La protéine core**

La protéine core, qui va former la capsid du virus, est la première protéine codée par le génome du VHC. Elle est clivée, au niveau de la jonction core-E1, par un signal peptidase (SP) cellulaire en une forme immature de 23kDa. Puis, la maturation se poursuit par le clivage du signal peptide, contenu dans sa partie C terminale. Le clivage se fait par le signal peptide peptidase (SPP) cellulaire, produisant une protéine de 21KDa (Figure 12) (**McLauchlan et al., 2002**). La maturation de la protéine core par la SPP est nécessaire à la formation des particules virales infectieuses (**Targett-Adams et al., 2008**).

La protéine core mature contient deux domaines. Le domaine 1, riche en acides aminés basiques, est impliqué dans la liaison avec la région 5'NTR de l'ARN du VHC, permettant la formation de la nucléocapside. La protéine core se localise sur la membrane du RE et sur les gouttelettes lipidiques (**McLauchlan et al., 2002**). Le

domaine 2, riche en acides aminés hydrophobes, assure cette localisation mais aussi le bon repliement et la stabilité de celle-ci (**Boulant et al., 2006**). L'introduction de mutations dans le domaine 2 perturbe la distribution de core, qui n'est plus associée aux gouttelettes lipidiques, ce qui a pour conséquence une baisse de la production de particules infectieuses (**Boulant et al., 2007**). La protéine core joue également un rôle important dans le recrutement des protéines non-structurales et des complexe de réplication (CR) au niveau des gouttelettes lipidiques (**Miyanari et al., 2007**). De plus, il a été rapporté que la protéine core interagit directement avec la tubuline, ce qui renforcerait la polymérisation des microtubules, afin de promouvoir le transport du virus et/ou l'assemblage du virus dans les cellules infectées (**Roohvand et al., 2009**). Ces observations suggèrent que l'association de core aux gouttelettes lipidiques est essentielle pour la morphogénèse du virion.

La protéine core pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de certains gènes cellulaires impliqués dans l'apoptose, le métabolisme lipidique et la prolifération cellulaire. En effet, core possède un pouvoir transformant conduisant à la formation de tumeurs quand elle est exprimée dans des souris transgéniques (**Ray et al., 1996**).

Cependant certaines de ces fonctions sont encore controversées. La protéine core stimule la lipogénèse en activant les facteurs de transcription RxR α (retinoïd x receptor α), SREBP (sterol regulatory element binding proteins) et FAS (fatty acid synthase) (**Syed et al., 2010**). Core interagit directement avec les facteurs RxR α et SREBP (**Roingeard and Hourieux, 2008**). D'un autre côté, core diminue l'expression du facteur nucléaire PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) qui régule de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des acides gras. De plus, il a été montré que chez des souris transgéniques exprimant la protéine core l'activité de la MTP (microsomal triglyceride transfer protein) est réduite, ce qui induit une réduction de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL (**Perlemuter et al., 2002**). Cependant, aucune interaction directe entre ces deux protéines n'a été montrée, suggérant une action indirecte de core sur l'activité de la MTP. La protéine core semble également s'accumuler dans les mitochondries, d'où elle induirait des dommages hépatiques, en produisant des radicaux libres ou ROS (reactive oxygen species) (**Okuda et al., 2002**).

- **La protéine ARFP**

En plus du cadre ouvert de lecture de la polyprotéine, des analyses de séquences ont montré l'existence d'un cadre de lecture alternatif (ARF) chevauchant avec la séquence codant pour la protéine core dans le cadre+1 (**Walewski et al., 2001**). Ce cadre alternatif code une petite protéine de 17kDa, appelée ARFP (Alternate Frame Reading Protein) (**Varaklioti et al., 2002**). La séquence codant l'ARFP est conservée dans différents génotypes du VHC quoique sa longueur varie en fonction du génotype (**Xu et al., 2003**). Après la traduction, cette protéine se localise dans le RE et sa demi-vie est estimée à dix minutes, car elle est dégradée par le protéasome (**Xu et al., 2003**). L'expression d'une forme tronquée de la protéine ARFP (8kDa) est inversement proportionnelle à la synthèse de la protéine de capsid core, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'expression de cette protéine durant l'infection virale (**Wolf et al., 2008**). L'abolition de la production de la protéine ARFP n'a aucun effet sur la réplication du VHC en culture cellulaire ou chez des souris uPA-SCID, suggérant que cette protéine n'est probablement pas importante lors des phases précoces de l'infection virale. Certains patients présentent des anticorps anti-ARFP et une réponse immunitaire anti-ARFP, suggérant que cette protéine est produite in vivo (**Bain et al., 2004; Komurian-Pradel et al., 2004**). De plus la protéine ARFP module le taux de cytokines (**Fiorucci et al., 2007**). Cependant, la fonction de l'ARFP est actuellement inconnue.

- **Les protéines E1 et E2**

Les protéines d'enveloppe **E1 et E2** sont les constituants principaux de l'enveloppe (**Dubuisson et al., 2002**). Elles participent à l'entrée cellulaire du HCV en se fixant aux récepteurs cellulaires et en induisant la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires de l'hôte (**Op De Beeck et al., 2001**). La protéine E2 est la cible préférentielle de la réponse immunitaire. Trois régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la protéine E2 : la région HVR1, à la partie N-terminale est constituée de 27 aa, la région HVR2 constituée de 9 aa et la région HVR3, comprise entre les régions HVR1 et HVR2, constituée de 35 aa (**Troesch et al., 2006**). Cette dernière est moins variable que les 2 autres. D'un point de vue conformationnel, la région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immune et dans l'attachement du virus à la cellule (**Penin et al., 2001**).

- **La protéine p7**

La protéine p7 est constituée de 63 acides aminés (acides aminés 747 à 809) et possède deux domaines transmembranaires connectés par une petite boucle riche en acides aminés basiques dirigée vers le cytoplasme et deux extrémités N- et C-terminales dirigées vers la lumière du RE (**Carrere-Kremer et al., 2002**) (Figure 11). Il a été décrit que cette protéine forme un oligomère possédant toutes les caractéristiques d'un canal ionique (**Carrere-Kremer et al., 2002**). La protéine p7 est essentielle à l'infection du VHC chez les chimpanzés (**Sakai et al., 2003**) et elle agit à une étape précoce de la morphogénèse des particules infectieuses (**Jones et al., 2007**). L'association de la p7 au RE semble également être importante pour l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses du VHC (**Steinmann et al., 2007**).

Récemment, en utilisant un microscope électronique à haute résolution (16Å) (single particle electron microscopy) Luik et al., ont décrit pour la première fois la structure 3D de cette viroporine (**Luik et al., 2009**) (Figure 13). Les protéines s'assemblent pour former un hexamère de 42kDa avec une architecture en pétale de fleur orientée vers la lumière du RE. La partie la plus large du canal présente une zone relativement grande offrant des sites potentiels pour l'interaction avec des protéines cellulaires ou virales présentes dans la membrane du RE (**Luik et al., 2009**).

- **La protéine NS2**

La protéine NS2 (acides aminés 810 à 1026) est une protéine transmembranaire (Figure 11), de 21-23kDa, non essentielle à la formation du complexe de réplication (**Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999**), mais elle est impliquée dans la formation de particules virales infectieuses, suggérant que cette protéine pourrait agir dans la morphogénèse du VHC (**Jones et al., 2007**). NS2 forme avec le tiers de la partie N-terminale de NS3 une protéase, qui assure le clivage entre la jonction NS2-NS3. L'analyse cristallographique du domaine catalytique de NS2 a révélé une protéase à cystéines dimérique avec deux sites actifs (Figure 15). Pour chaque site catalytique, les résidus His143 et Glu13 d'un monomère et le résidu Cys184 de l'autre monomère constituent le site actif de la protéase NS2 (**Lorenz et al., 2006**). Après clivage de la jonction NS2-NS3, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent et l'activité protéasique est perdue.

La partie N-terminale de NS2 a d'abord été suggérée comme impliquée dans l'infectivité du VHC (**Pietschmann et al., 2006**). Par la suite, il a été montré que la première région transmembranaire de NS2 est importante pour la production de virions infectieux. Plusieurs résidus sont impliqués mais tout particulièrement un résidu glycine (Gly 10), en position centrale de la première région transmembranaire, est essentiel à l'assemblage des particules du VHC (**Jirasko et al., 2008**). De plus, le domaine protéasique de NS2, mais pas son activité catalytique, est essentiel à la formation de particules infectieuses (**Jirasko et al., 2008; Lorenz et al., 2006**). Très récemment, Dentzer et al., ont montré que la mutation des résidus à l'interface du dimère ou dans la région C-terminale n'a pas d'incidence sur la réplication, la stabilité de NS2, ou l'activité de la protéase NS2, mais diminue la production de virus infectieux (**Dentzer et al., 2009**). Le Leu217 du domaine C-terminal semble très important pour la production de particules infectieuses (**Dentzer et al., 2009**)

- **La protéine NS3-NS4A**

La protéine NS3 (acides aminés 1027 à 1657) est une protéine multifonctionnelle. La partie N-terminale en association avec la protéine NS4A (acides aminés 1658 à 1711), une sérine protéase sont responsables des clivages en aval de NS3 (**Bartenschlager et al., 2004**). La triade catalytique est formée des résidus, His(57)1083, Asp(81)1107 et Ser(139)1165. La protéine NS4A est nécessaire à la stabilisation de la protéine NS3 et grâce à sa partie N-terminale hydrophobe, à l'ancrage du complexe NS3/4A à la membrane du RE (**Wolk et al., 2000**). La sérine protéase NS3/4A possède une poche dans laquelle se loge le substrat. Cette poche, particulièrement peu profonde, rend le développement d'inhibiteurs difficiles (**Bartenschlager et al., 2004**).

La partie C-terminale de la protéine NS3 possède une activité hélicase et NTPase (**Tai et al., 1996**). Les enzymes de cette superfamille sont capables, en présence d'ATP, de séparer des duplexes ARN-ARN. Bien que la forme monomérique de NS3 soit capable de se lier à l'ARN, le déroulement de l'ARN requiert un dimère de NS3 (**Serebrov and Pyle, 2004**). L'activité hélicase est nécessaire à la réplication de l'ARN. Il est possible qu'elle agisse lors de l'initiation de la réplication de l'ARN du VHC, en déroulant les structures secondaires des brins (+) et (-) du génome viral. Elle pourrait également contribuer à la processivité du complexe de réplication en

éliminant les structures secondaires internes et/ou en déplaçant les protéines liées à l'ARN. Il a d'ailleurs été décrit que NS3 peut interagir avec certaines protéines cellulaires (les kinases PKA et PKC et l'oncogène p53) (**Tellinghuisen and Rice, 2002**) mais aussi avec NS5B, ce qui a pour effet de moduler l'activité hélicase de NS3 (**Jennings et al., 2008**). La NS3 pourrait également servir à dissocier la forme répliquative de l'ARN. Enfin, NS3 serait également impliquée dans l'assemblage de particules infectieuses (**Ma et al., 2008**).

Par ailleurs, la protéase NS3/4 est impliquée dans l'inhibition de la réponse IFN dans les cellules infectées. En effet, la protéase clive deux protéines adaptatrices, TRIF et Cardif, impliquées dans la voie de signalisation de l'IFN (**Gale and Foy, 2005**).

- **La protéine NS4B**

La protéine NS4B (acides aminés 1712 à 1972) est une protéine hydrophobe, de 27 kDa, intégralement associée aux membranes du RE (**Hugle et al., 2001**). La NS4B induit la formation d'un compartiment membranaire spécialisé, dérivé des membranes du RE, appelé le "membranous web", siège de la réplication de l'ARN viral (**Egger et al., 2002**). La NS4B contient au moins quatre domaines transmembranaires. Les domaines N- et C-terminal sont orientés vers le cytosol. Néanmoins, une fraction de l'extrémité N-terminale est détectée dans la lumière du RE. Cette extrémité N-terminale semble responsable de la formation du "membranous web" (**Lundin et al., 2006**). Les parties N- et C-terminales sont également importantes pour la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (**Gouttenoire et al., 2009a; Gouttenoire et al., 2009b**).

- **La protéine NS5A**

La NS5A (acides aminés 1973 à 2420) est une phosphoprotéine (56–58 kDa) ancrée dans la membrane du RE, grâce à son extrémité N-terminale qui est repliée en une hélice α amphiphile (H1) (**Brass et al., 2002; Penin et al., 2004**). Cette hélice α pourrait servir de plate-forme, impliquée dans des interactions protéine-protéine nécessaires à l'assemblage d'un CR fonctionnel (**Penin et al., 2004**).

La protéine NS5A est composée de trois domaines distincts (I, II et III), séparés par des séquences de moindre complexité (LCSI et II) (**Tellinghuisen et al., 2004**).

- ✓ **Le domaine I** permet la fixation de l'ARN (**Tellinghuisen et al., 2005**). Il comporte un sous-domaine N-terminal IA exclusivement basique et un sous-domaine C-terminal IB majoritairement acide (**Tellinghuisen et al., 2005**). Le sous-domaine IA contient quatre résidus de cystéines qui fixent un ion zinc

dont la mutation abolit la réplication. Le sous-domaine IB contient deux résidus cystéines liés par un pont disulfure, qui ne paraît pas être essentiel pour la réplication. Le domaine I forme des homodimères, par une interaction au voisinage des extrémités N-terminales, formant un sillon basique localisé sur la membrane, qui est le site d'ancrage de l'ARN. La protéine NS5A interagit avec l'ARN viral avec une haute affinité pour la partie riche en pyrimidines de l'extrémité non traduite du brin (+) (**Huang et al., 2005**).

- ✓ **Le domaine II** est impliqué dans l'inhibition de la protéine kinase PKR, activée par l'IFN en réponse à la présence d'ARN double brin dans la cellule (**Gale et al., 1998**). De plus, il a été récemment montré que NS5A bloque la voie de signalisation de l'IFN en inhibant la phosphorylation de STAT1, impliqué dans l'activation des ISG (**Lan et al., 2007**). Le domaine II est également important pour la réplication de l'ARN du VHC (**Tellinghuisen et al., 2008b**).
- ✓ **Le domaine III** est peu conservé entre les génotypes et n'est pas nécessaire à la réplication (**Appel et al., 2005**). Ce domaine a été utilisé pour insérer des gènes rapporteurs tels que la GFP lors de la construction de réplicons subgénomiques (**Appel et al., 2005; Moradpour et al., 2004**).

Les données actuelles indiquent que NS5A pourrait fonctionner comme un interrupteur moléculaire entre la réplication et l'assemblage. En effet, l'état de phosphorylation de cette protéine affecte la réplication de l'ARN VHC et il existe une corrélation inverse entre les mutations adaptatives NS5A facilitant la réplication et la production de virus (**Appel et al., 2005; Evans et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2008a**). Tellinghuisen et al., ont récemment identifié un résidu essentiel, la Ser457, phosphorylée par une kinase cellulaire (la caséine kinase II (CKII)), ce qui a pour effet de réguler la production de nouvelles particules infectieuses (**Tellinghuisen et al., 2008a**).

La protéine humaine VAP-A (vesicle-associated membrane protein-associated protein A) dont l'interaction avec NS5A est nécessaire pour la réplication, est régulée par la phosphorylation de NS5A (**Evans et al., 2004**). En effet, l'hyperphosphorylation de NS5A bloque l'interaction avec VAP-A et limite donc la réplication virale. VAP-A est trouvée dans les membranes du RE et de l'appareil de Golgi et intervient dans la mobilité intracellulaire des vésicules, mais il reste à déterminer pourquoi cette protéine est détournée par NS5A à certaines étapes du cycle viral.

- **La protéine NS5B**

La NS5B (acides aminés 2421 à 3011) est l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. Elle possède le motif Gly-Asp-Asp (GDD) et une structure 3D en main droite, caractéristique des polymérases (**Bressanelli et al., 1999; Poch et al., 1989**). Le site catalytique, représenté par la paume de la main, est surplombé des domaines pouce et doigts qui forment un tunnel par lequel l'ARN simple brin est directement amené au site actif (**Bressanelli et al., 2002**). Un autre tunnel, chargé positivement, permet l'entrée des nucléotides nécessaires à l'élongation de l'ARN viral au niveau du site actif. Il est communément admis que la liaison de l'ARN matrice et l'initiation de la synthèse sont régulées par une tige-boucle beta très flexible localisée dans le sous-domaine pouce et orienté vers le site actif (**Hong et al., 2001**). Comme d'autres polymérases virales, la NS5B est une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antivirales contre le VHC (**De Francesco and Migliaccio, 2005**).

NS5B est ancrée dans la membrane du RE par son domaine transmembranaire C-terminal (**Ivashkina et al., 2002**). L'association de la NS5B à la membrane du RE est indispensable à la réplication du VHC (**Moradpour et al., 2004**)(**Moradpour et al., 2004**).

L'activité de la NS5B est modulée par des interactions avec les protéines virales NS3 et NS5A (**Bartenschlager et al., 2004**). La cyclophiline B, un peptidyl-propyl cis-trans-isomérase, améliore l'affinité pour l'ARN de la NS5B, en interagissant avec sa partie C-terminale et stimule la réplication virale (**Watashi et al., 2005**). Cependant le rôle de la cyclophiline B reste encore controversé. La cyclosporine A et le DEBIO-025, un analogue de cette dernière, sont des inhibiteurs des cyclophilines et ils inhibent la réplication du VHC en culture cellulaire (**Kaul et al., 2009; Watashi et al., 2003**).

2.2. Réplication virale et évolution de l'infection

Depuis la découverte du VHC, différents modèles d'études ont été développés mais aucun ne permettait l'étude du cycle complet du HCV et la production de particules VHC infectieuses de façon efficace (**Burlone and Budkowska, 2009**). Les virus provenant de sérums de patients se répliquaient très faiblement sur des cultures d'hépatocytes primaires *in vitro*. Récemment, la mise au point d'un système de culture cellulaire du HCV sur lignée hépatocytaire Huh-7 (HCVcc) a permis

d'accélérer l'étude et la compréhension des différentes étapes du cycle de réplication virale du HCV et en particulier les étapes d'entrée dans la cellule hôte (**Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005**).

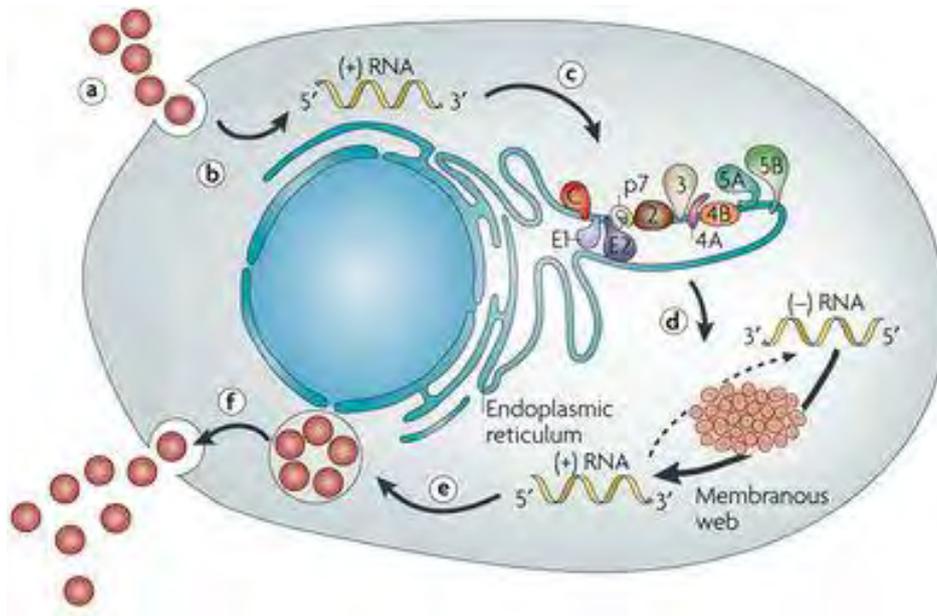


Figure 16. Vue d'ensemble de cycle de réplication du VHC (**Moradpour et al., 2007**).

a) la liaison du virus et de l'internalisation; b) la libération cytoplasmique et décapsidation; c) la traduction IRES-médiation; d) l'emballage et l'assemblage e) maturation des virions et f) la libération; la topologie des protéines structurales et non structurales du VHC à la membrane du réticulum endoplasmique est représenté schématiquement.

Les cellules hépatocytaires sont le site principal de réplication virale du HCV. L'identification des particules virales se fixant aux cellules hôtes et des récepteurs d'entrée a été possible dans un premier temps grâce au modèle des pseudoparticules HCV. Les virions HCV, libres ou associés à des apolipoprotéines, interagissent en cascade avec de nombreux récepteurs présents à la surface des hépatocytes. La première interaction virus-hépatocytes fait intervenir des glycosaminoglycans (GAGs) et des récepteurs des lipoprotéines (LDLR). Ensuite, le récepteur cellulaire scavenger classe B site I (SR-BI) (**Scarselli et al., 2002**) formerait avec le récepteur cellulaire CD81 (**Pileri et al., 1998**) un complexe permettant le transfert du HCV au niveau des jonctions serrées. Ceci permet l'interaction du virus avec des protéines de jonctions serrées : claudin-1 (CLDN1) (**Evans et al., 2007**) et occludines (OCLN) (**Liu et al., 2009**). Ces dernières facilitent l'internalisation du HCV par endocytose des récepteurs de surface liés aux particules HCV, via une voie clathrine dépendante. Dans les endosomes, le faible pH

déclenche la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes endosomales et la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme.

Suite à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule, la traduction coiffe indépendante est réalisée par la machinerie de traduction cellulaire. L'IRES de la région 5'NC, à travers ses domaines II et III, permet le positionnement de la sous unité 40S du ribosome directement au niveau du codon initiateur inclus dans sa structure. La synthèse protéique, qui a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), est ensuite réalisée grâce au recrutement de multiples protéines cellulaires. La polyprotéine, pendant et après sa synthèse, est la cible de clivages effectués par des protéases soit cellulaires, soit virales. Les protéines virales structurales sont les premières à être maturées par le signal peptide peptidase et signal peptidase du RE. La protéine de capsid est retrouvée au niveau des gouttelettes lipidiques et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont ancrées à la membrane du RE. Les protéines non structurales, issues des clivages par NS2/NS3 et NS3/4A vont, quant à elles, à l'exception de NS2, former le complexe de réplication (**Gastaminza et al., 2008; Suzuki et al., 2007**).

Comme la traduction, la réplication est régulée par l'action d'éléments de séquence en cis situés dans les régions non codantes. La réplication commence à l'extrémité 3' de l'ARN génomique aboutissant à la synthèse du brin de polarité négative. La région 3'NC contient 2 éléments essentiels à la réplication : la séquence poly (U/C) et les 3 tiges-boucles de la région X (structure en trèfle). La région poly (U/C) permet la fixation de la PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) qui se fixe également dans la région 5'NC : cela conduit à l'hypothèse selon laquelle la PTB circulariserait le génome en formant un pont entre les deux extrémités. Le processus de réplication est supposé se faire en deux temps, tous les deux catalysés par NS5B : dans un premier temps, le brin de polarité positive sert de matrice pour la synthèse du brin de polarité négative ; dans un second temps, le brin de polarité négative sert également de matrice pour la production de plusieurs brins d'ARN de polarité positive. Il existe un déséquilibre en faveur de la synthèse du brin de polarité positive qui est utilisé comme matrice pour obtenir de nouveaux intermédiaires de réplication (phase de réplication), pour générer les protéines virales (phase de traduction) et aussi pour la formation de nouvelles nucléocapsides. Il est important de noter que le complexe de

réplication aurait un rôle protecteur contre les RNases et les protéases (**Suzuki et al., 2007**).

La découverte de nouveaux systèmes de cultures cellulaires du HCV a permis d'étudier les étapes tardives du cycle répliatif telles que l'assemblage des particules et la libération des virions. L'assemblage des particules virales à l'interface du RE et des organelles de stockage des matières grasses appelées «gouttelettes lipidiques» est déclenchée par l'association des protéines du core aux lipides (**Miyanari et al., 2007**). La cocalisation du complexe de réplication avec les protéines d'enveloppe du HCV facilite la production des virus infectieux. Ils sont ensuite libérés dans la lumière du RE et relargués à l'extérieur de la cellule par la voie de sécrétion des VLDL (**Huang et al., 2007**).

Il a récemment été montré *in vitro* que le HCV pouvait être transmis de cellules à cellules et que cela nécessitait la présence des récepteurs cellulaires CD81 et CLDN1 (**Timpe et al., 2008**).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 impliquées dans l'entrée cellulaire s'assemblent pour former un hétérodimère. La glycoprotéine E2 joue un rôle majeur dans l'interaction avec les récepteurs SR-BI et CD81. Trois régions (AA 480 à 493, AA 528 à 535 et AA 544-551) sont impliquées dans l'interaction E2/CD81 (**Flint et al., 2006**) et plus récemment, des résidus spécifiques et conservés au sein des différents génotypes ont été décrits (W420, Y527, W529, G530 et D535) (**Owsianka et al., 2006**). La région HVR1 de E2 participe à l'interaction E2/SR-BI (**Scarselli et al., 2002**). Cette région très variable, participe à l'échappement viral face à la réponse immunitaire de l'hôte. Le rôle de la protéine E1 reste peu connu. Elle serait impliquée dans le processus de fusion des membranes (**Lavillette et al., 2007**).

Les récepteurs et/ou co-récepteurs cellulaires principaux sont CD81, SR-BI, Claudin-1 et les occludines :

- **CD81** est une protéine membranaire de la famille des tétraspanines qui est exprimée de manière ubiquitaire. Les études publiées montrent qu'elle interviendrait dans l'entrée du HCV après l'étape de fixation des particules virales à la membrane cellulaire. En effet, les anticorps dirigés contre CD81 inhibent l'infection HCV après l'étape d'attachement (**Flint et al., 2006**; **Koutsoudakis et al., 2006**). La susceptibilité des cellules à l'infection par HCV est liée non seulement au niveau d'expression de CD81 mais aussi à la proportion de CD81 à la surface cellulaire (**Laguno et al., 2007**). EWI-2wint,

un partenaire cellulaire de CD81 exprimé à la surface cellulaire, bloque efficacement l'entrée du virus dans les cellules en inhibant l'interaction virus-CD81 (**Rocha-Perugini et al., 2008**). L'absence de cet inhibiteur naturel de CD81 sur les cellules hépatocytaires pourrait expliquer l'entrée du virus dans les hépatocytes et l'hépatotropisme du HCV. CD81 joue également un rôle essentiel dans l'infectiosité en activant les Rho GTPases ce qui provoque le remodelage des filaments d'actine et la relocalisation du complexe E2/CD81 au niveau des aires de contact cellulaires où se trouvent CLDN1 et les occludines. CD81 active la cascade de signalisation Raf/MEK/ERK, impliquée dans les étapes post-entrée du virus et possiblement dans la réplication (**Brazzoli et al., 2008**).

- **SR-BI** est une glycoprotéine exprimée principalement dans le foie et dans les tissus synthétisant les stéroïdes. C'est le récepteur de nombreux ligands, notamment des lipoprotéines (**Rhainds and Brissette, 2004**). SR-BI se lie au HCV par la partie HVR1 de la glycoprotéine E2. Comme le CD81, ce récepteur cellulaire interviendrait après l'attachement du virus à la cellule (**Zeisel et al., 2007**). Le ligand majeur de SR-BI, le HDL, faciliterait l'entrée cellulaire des HCVpp ou HCVcc, sans interaction directe connue entre le HDL et les particules virales HCV (**Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005**). Récemment, l'activité antivirale de l'interféron a été liée à une diminution du niveau d'expression de SR-BI réduisant ainsi l'attachement et l'entrée des virus dans les hépatocytes (**Murao et al., 2008**).
- **CLDN-1** est une nouvelle protéine de la famille des claudines impliquée dans l'entrée du HCV (**Evans et al., 2007**). Elle est exprimée dans tous les tissus épithéliaux mais est prédominante dans le foie, formant les réseaux de jonctions serrées. L'expression de ce récepteur dans des lignées non hépatocytaires les rend susceptibles à l'infection par HCVpp. Ce récepteur interviendrait après les récepteurs cellulaires SR-BI et CD81. Les premières étapes de fixation des particules virales ciblent des récepteurs cellulaires qui activent des voies de signalisation cellulaires permettant ainsi le transfert du virus au niveau des jonctions serrées. La distribution de CLDN-1 au niveau des jonctions serrées est corrélée à la permissivité à l'infection HCV. L'infection par HCV de lignées cellulaires hépatocytaires Huh-7 diminue l'expression de CLDN-1, prévenant ainsi les sur-infections (**Liu et al., 2009**).

- Les **CLDN-6 et 9** pourraient également participer à l'entrée du HCV (**Zheng et al., 2007**). Elles sont exprimées dans le foie mais également sur les cellules mononucléées du sang périphérique, qui est un site possible de réplication virale. Ces 3 récepteurs, CLDN-1, CLDN-6 et CLDN-9 possèdent une région très conservée, la boucle extracellulaire EL1, qui semble impliquée dans l'entrée du HCV (**Evans et al., 2007**).
- les **occludines** ont été dernièrement impliquées dans l'entrée du HCV (**Liu et al., 2009**). Composant des jonctions serrées, elles sont proches des claudines d'un point de vue tridimensionnel. Elles interagiraient avec la glycoprotéine E2. Les occludines humaines rendent les cellules murines infectables par HCVpp (**Ploss et al., 2009**).

L'infection par HCV peut altérer la localisation et l'expression des protéines CLDN-1 et occludines induisant une diminution des jonctions serrées au niveau des hépatocytes infectés (**Benedicto et al., 2008**). Les jonctions serrées étant des éléments essentiels au maintien de la polarité des hépatocytes et à leurs fonctions, altérer leur expression peut donc aboutir à divers symptômes tels que les désordres cholestatiques.

3. Diversité génétique du VHC

3.1. Origine de la variabilité génétique

Le VHC présente une grande diversité génétique qui résulte de l'absence d'activité exonucléasique 5'-3' de l'ARN polymérase ARN dépendante, mais également du niveau élevé de réplication. La fréquence moyenne de mutation nucléotidique par site et par an varie de $1,4 \cdot 10^3$ à $1,9 \cdot 10^3$ (**Ogata et al., 1991**). La majorité des mutations accumulées pendant la réplication sont silencieuses ou synonymes et n'ont pas d'impact sur la séquence en aa de la protéine virale. Les mutations non-synonymes par contre provoquent un changement de la séquence en aa de la protéine virale et peuvent induire l'émergence de polymorphismes. Certaines mutations peuvent être à l'origine de particules virales défectives ou être létales. Le polymorphisme génétique varie d'un gène à l'autre. Des régions plus ou moins polymorphes ont également été identifiées au sein d'un même gène (**Salemi and Vandamme, 2002**). Les protéines impliquées dans la transcription ou la réplication et les régions qui ont des contraintes conformationnelles sont les plus conservées. La

région 5'NC est l'une des régions les plus conservées du génome avec plus de 90% d'homologies entre les séquences de différentes souches (**Bukh *et al.*, 1992**). La région codant la capsid est également très conservée avec 81 à 88% d'homologie de séquence entre isolats (**Simmonds *et al.*, 1994**). La région la plus variable du génome est celle codant pour les protéines d'enveloppe E1 et E2. Les séquences codant les régions hypervariables HVR1, HVR2 et HVR3 de la glycoprotéine E2 peuvent varier de 50% d'une souche une autre (**Smith, 1999; Troesch *et al.*, 2006**)

3.2. Les différents génotypes, sous types et formes recombinants

3.2.1. La variabilité inter-individus

La classification du HCV a été réalisée par des approches de phylogénie et ont permis de classer les variants en 6 génotypes qui peuvent être subdivisés en différents sous-types correspondant à des sous-groupes de virus plus proche au sein d'un génotype (**Robertson *et al.*, 1998**). Un système de nomenclature consensuel a été proposé pour la classification des génotypes et sous-types du HCV (**Simmonds *et al.*, 2005**). La méthode de choix pour assigner un génotype à un virus HCV est l'analyse phylogénétique de la région core/E1, NS5B ou du génome complet. La désignation d'un nouveau génotype nécessite une analyse phylogénétique de la séquence complète du nouveau variant du HCV, montrant qu'il appartient à un groupe distinct des autres et montrant l'absence de recombinaison. La désignation d'un génotype sera confirmée si au moins 2 génomes complets d'infection VHC sans lien épidémiologique sont séquencés. La désignation d'un sous-type nécessite l'identification d'au moins 3 infections avec la détermination des séquences des régions Core/E1 et NS5B.

Les génotypes diffèrent les uns des autres par une variabilité de séquence nucléotidique de 31-33%, et les sous-types par une variabilité de 20-25% sur l'ensemble du génome. Malgré la diversité de séquence du HCV, tous les génotypes partagent la même organisation génomique linéaire, avec des gènes de tailles similaires ou identiques au niveau du cadre de lecture ouverte. Ceci a permis pour beaucoup de variants actuellement connus d'être classés provisoirement, sur la base de l'analyse de régions partielles du génome telles que core/E1 ou NS5B (**Simmonds *et al.*, 1994**).

La détermination du génotype est primordiale puisque les génotypes 1 et 4 sont plus résistants que les génotypes 2 ou 3 au traitement par interféron α pégylé et ribavirine et que la durée du traitement est adaptée au génotype. Les tests de génotypage sont basés sur l'analyse d'une portion de génome amplifié. Le plus souvent c'est la région 5'NC, ciblée par la plupart des tests de détection ou de quantification de l'ARN HCV, qui est utilisée pour déterminer le génotype. Bien que cette région soit hautement conservée, un certain nombre de polymorphismes permet de déterminer le génotype. La technique de référence pour le génotypage HCV est néanmoins basée sur une amplification suivie du séquençage et de l'analyse phylogénétique des régions codantes. La région NS5B a l'intérêt d'être représentative du génome complet. En effet, la topologie des arbres réalisés avec des séquences de génomes complets ou de la région NS5B sont identiques (**Hraber et al., 2006**). Cependant, compte tenu des contraintes techniques et du coût d'une telle approche, des techniques alternatives ont été développées. Les différentes méthodes utilisées pour déterminer le génotype viral sont : le typage sérologique (mise en évidence d'anticorps spécifiques d'un génotype dirigé contre certaines protéines virales) et le typage génomique (caractérisation d'un fragment du génome viral par une approche moléculaire).

3.2.2. La variabilité intra-individus

Le VHC, comme de nombreux virus à ARN, circule chez l'hôte sous forme de quasi-espèce virale, c'est-à-dire d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants génétiquement distincts mais apparentés (**Domingo and Gomez, 2007; Martell et al., 1992**). En effet, la présence simultanée de variants viraux permet la sélection rapide et continue des variants les mieux adaptés à l'environnement dans lequel le virus se réplique. La capacité d'adaptation des quasi-espèces virales aux modifications de l'environnement joue un rôle important dans la physiopathologie de l'infection, aussi bien dans les mécanismes de persistance virale que dans la résistance aux traitements antiviraux ou la récurrence de l'infection après transplantation hépatique.

A un instant donné de l'infection, la quasi-espèce virale d'un patient infecté est en équilibre. Cependant, les quasi-espèces évoluent en permanence pour s'adapter à l'environnement au sein duquel le virus se réplique et ce, sous l'influence de

pressions sélectives telles que la réponse immunitaire, les protéines cellulaires de l'hôte ou le traitement anti-viral. L'évolution virale se fait en 2 étapes :

- la première est l'introduction continue de mutations dans le génome viral due au manque d'activité correctrice de la RdRp induisant des erreurs répliquatives.
- la seconde étape est la sélection au cours de laquelle les génomes mutés sont sélectionnés par pression de sélection naturelle ou imposée.

L'accumulation des mutations au cours de la réplication est répartie sur toute la longueur du génome. Certaines régions du génome subissent de plus fortes pressions de sélection. C'est le cas de la région HVR-1 de la glycoprotéine E2, cible des anticorps anti-HCV. La forte pression de sélection immunitaire sur cette région est responsable de sa variabilité au cours de l'infection chronique et sous traitement antiviral (**Chambers et al., 2005**). Cependant, son rôle dans l'attachement aux récepteurs cellulaires d'entrée impose également la conservation de sa conformation tridimensionnelle et de certains résidus basiques (**Callens et al., 2005; Penin et al., 2001**).

3.2.3. Les formes recombinantes

La recombinaison génétique constitue un phénomène rarement observé pour le HCV. La mise en évidence de génomes recombinants du HCV est assez difficile car il nécessite le séquençage de 2 régions différentes. Or les méthodes de génotypage sont basées sur l'analyse d'une seule région du génome HCV. Un génome recombinant est confirmé grâce au séquençage du génome complet et à des analyses clonales qui permettent d'éliminer la présence éventuelle d'une infection mixte. Différents travaux ont montré l'existence de souches recombinantes. Le premier virus recombinant décrit a été une souche 2k/1b découverte en Russie (**Kalinina et al., 2002**). Les autres virus recombinants caractérisés ont été une souche 2i/6p au Vietnam (**Noppornpanth et al., 2006**), une souche 2b/1b aux Philippines (**Kageyama et al., 2006**), une souche 2/5 chez un patient de la région Midi-Pyrénées (**Legrand-Abravanel et al., 2007**) et dernièrement une souche 2b/6w (**Lee et al., 2010**). Chez des chimpanzés inoculés simultanément avec des sous-types 1a, 1b, 2a, et 3a, des recombinaisons entre les différents génomes ont été observées après analyse clonale (**Gao et al., 2007**). Des infections mixtes étant possibles chez l'homme, des phénomènes de recombinaison peuvent donc être

envisagés. La souche 2k/1b semble avoir diffusé en Europe chez les patients toxicomanes (**Moreau et al., 2006**), en Russie et en Ouzbékistan (**Kurbanov et al., 2008a**). La sensibilité de cette souche à un traitement par interféron α pégylé et ribavirine a été étudiée chez des souris humanisées avec des hépatocytes humains et infectées par une souche 2k/1b. Cette souche présentait une bonne sensibilité au traitement (**Kurbanov et al., 2008b**). C'est actuellement la seule étude ayant évalué la sensibilité d'un virus recombinant HCV à un traitement par interféron.

Les recombinants décrits sont le plus souvent intergénomiques cependant quelques virus intragénomiques ont été identifiés : un 1a/1b chez un patient péruvien (**Colina et al., 2004**) et un 1a/1c en analysant 89 génomes complets disponibles dans la banque de données Genbank (**Cristina and Colina, 2006**). Plus récemment, un virus mosaïque 1a/1c (AY651061) a été décrit (**Ross et al., 2008a**). Ce virus a une organisation génomique complexe avec 5 points de cassure potentiels de la région core à NS3. Des « échanges » de morceaux de génome entre virus sont donc possibles.

Une localisation préférentielle des points de recombinaison au niveau NS2-NS3 semble exister *in vivo* et *in vitro* (**Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006; Yi et al., 2007**). Des chimères HCV construites avec un point de cassure à la jonction p7-NS2 ne produisaient pas de particules infectieuses dans le surnageant de culture cellulaire, malgré la réplication du génome (**Yi et al., 2007**). Le point de recombinaison des souches 2i/6p, 2b/1b, 2/5 et 2b/6w est localisé à la jonction de NS2 et NS3. Le point de recombinaison de la souche 2k/1b est situé au niveau de NS2. Pour les recombinants intragénomiques, le point de cassure semble préférentiellement localisé au niveau des gènes E1-E2. Deux mécanismes de recombinaison ont été décrits pour les virus à ARN : (i) un mécanisme de choix de copie correspondant à un changement de matrice lors de la réplication, dépendant de la processivité de l'enzyme et (ii) un mécanisme de recombinaison non réplcatif qui implique la ligation simple de 2 fragments d'ARN. Pour le premier mécanisme, plusieurs facteurs peuvent expliquer l'arrêt et le décrochage de la polymérase lors de l'élongation : un défaut de continuité de la matrice, la présence de séquences spécifiques ou de motifs structuraux, une erreur d'incorporation d'un nucléotide ou une interaction du génome avec une protéine qui ne participe pas à la réplication (**Figlerowicz et al., 2003**).

3.3. Répartition des sous types et formes recombinantes dans le monde

Les génotypes et sous-types ont une distribution géographique mondiale variable (**Zein, 2000**). Les génotypes 1a, 1b, 2 et 3 sont répartis dans le monde entier. Les études épidémiologiques et d'évolution moléculaire ont montré que la dissémination des génotypes et sous-types coïncidait avec des pratiques défaillantes en matière d'administration parentérale (**Frank et al., 2000; Tanaka et al., 2004**). La dissémination dans le monde, au 20^{ème} siècle, a débuté avec l'administration de produits sanguins infectés, l'injection intraveineuse de drogues et la pratique de gestes invasifs contaminants (**Mizokami et al., 2006; Pybus et al., 2001**). Au début des années 90, les génotypes 1, 2 et 3 étaient les plus représentés chez les donateurs de sang et les patients infectés en Europe (**McOmish et al., 1994**). En France, les génotypes 1b et 2 sont retrouvés plus fréquemment chez des patients transfusés et ont plus de 50 ans alors que les génotypes 1a ou 3a sont généralement retrouvés chez des patients qui ont une histoire de toxicomanie intraveineuse et ont moins de 50 ans (**Martinot-Peignoux et al., 1999**). Le génotype du VHC majoritaire est le 1, puis le génotype 3a, et ensuite le génotype 2. Parmi les patients infectés par un génotype 1, 26-30% sont infectés par un sous-type 1b et 19-33% par un sous-type 1a (**Payan et al., 2005; Tamalet et al., 2003**). A eux deux, ils représentent près de 60% des infections en Europe de l'Ouest et infectent la majorité des patients atteints d'infection HCV aux Etats-Unis.

L'analyse des relations phylogénétiques a permis de comprendre l'émergence et la diversification des différents génotypes au fil des siècles. Les virus de génotype 1, 2 et 4 sont endémiques en Afrique et les virus de génotype 3 et 6 en Asie (**Mellor et al., 1995; Simmonds, 2001**). Le génotype 5 du VHC est dominant en Afrique du Sud, qui pourrait être la région endémique (**Ohno et al., 1994; Prabdial-Sing et al., 2008**). Les souches dites « endémiques » reflètent une transmission à bas bruit mais sur le long terme et sont supposées être la source des souches épidémiques. Plus précisément, le génotype 2 du HCV est endémique dans les pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale (Guinée-Bissau, Bénin, Burkina Faso, Ghana) et présente une diversité extrêmement importante (**Candotti et al., 2003; Jeannel et al., 1998; Markov et al., 2009; Ruggieri et al., 1996**). Il a également été retrouvé en Martinique avec une diversité importante suggérant une introduction assez ancienne (**Martial et al., 2004**). Les génotypes 2a et 2b sont assez communs en Amérique du

Nord, au Japon et en Europe tandis que le sous-type 2c est très présent en Italie (**Ansaldo *et al.*, 2005**). Le génotype 4 du HCV émerge depuis une dizaine d'années dans les pays européens principalement par toxicomanie avec une prédominance des sous-types 4a et 4d (**Morice *et al.*, 2001; Tamalet *et al.*, 2003; van Asten *et al.*, 2004**). En Espagne les sous-types 4c et 4d sont prédominants (**Fernandez-Arcas *et al.*, 2006**), et en Italie le sous-type 4d est majoritaire (**Argentini *et al.*, 2000**). Dans ce pays, la prévalence du génotype 4 serait plus importante en Sicile. Ce génotype est endémique en Afrique Centrale, et plus particulièrement au Cameroun (**Njouom *et al.*, 2009; Njouom *et al.*, 2007; Njouom *et al.*, 2003**). Il existe une grande diversité des virus de génotypes 4, circulant simultanément dans des régions bien définies. Le génotype 4 du VHC a également une forte prévalence au Moyen-Orient, en particulier en Egypte (**Angelico *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 2000**) où le sous type prédominant est 4a.

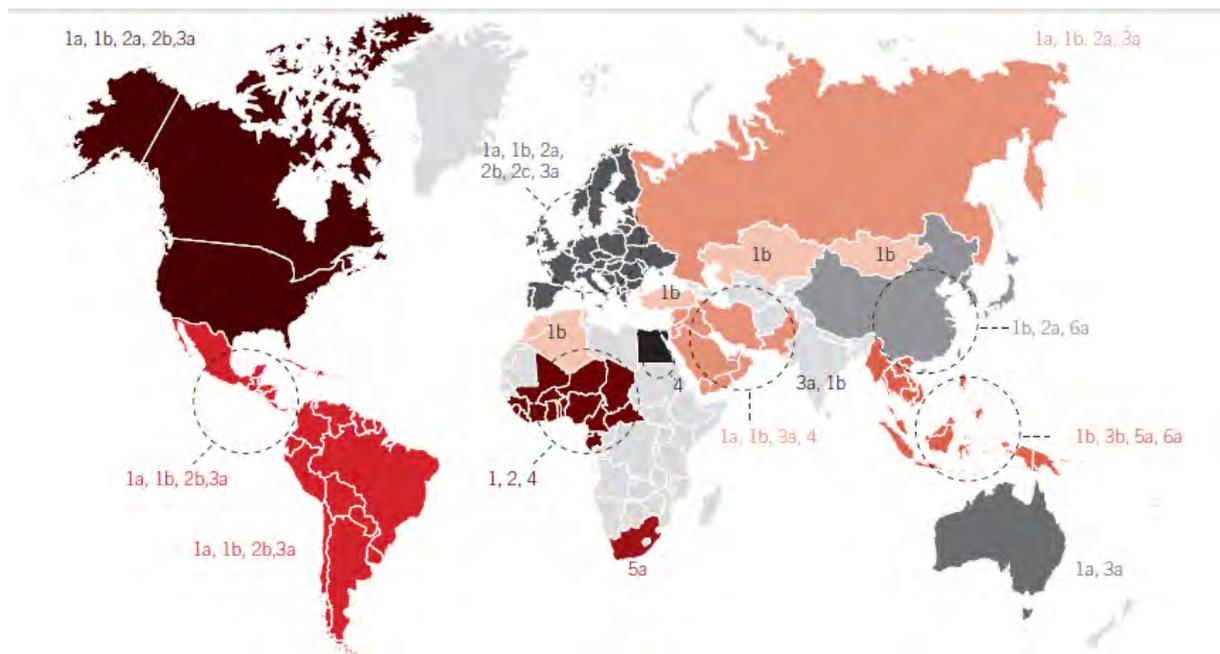


Figure 17 : répartition géographique des sous types et formes recombinantes (**Hussain, 2013**)

3.4. Impact de la diversité génétique sur le traitement

L'une des conséquences majeures de la diversité génétique du HCV est la variabilité de la réponse au traitement en fonction du génotype (**Fried *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004; Manns *et al.*, 2001; Poynard *et al.*, 1998**). Les patients infectés par un virus de génotype 2 ou 3 répondent à une bithérapie interféron

pégylé et ribavirine dans environ 80% des cas. En revanche, ceux infectés par un génotype 1 répondent dans seulement 40-50 % des cas. Les études concernant le taux de RVS des patients infectés par un virus de génotype 4 montrent des résultats assez contradictoires : les premières études ont observé un taux de réponse d'environ 40% assez proche de celui des génotypes 1 (**Alfaleh et al., 2004**), alors que d'autres études ont montré un taux de réponse plus élevé 50-79% (**Diago et al., 2004; Kamal, 2009; Kamal et al., 2005; Legrand-Abravanel et al., 2005; Trapero-Marugan et al., 2007**). Le génotype 4 du HCV aurait donc une sensibilité au traitement intermédiaire entre les virus de génotype 1 et ceux de génotype 2/3. Les patients infectés par génotype 3 répondraient moins bien au traitement que les patients infectés par un génotype 2 (79% versus 83%) (**Zeuzem et al., 2004**). Les patients infectés par un génotype 5, sur la base d'études rétrospectives, répondent dans 56% à 83% (**Bonny et al., 2006; Delwaide et al., 2005; Legrand-Abravanel et al., 2004**). Enfin, les études réalisées sur le génotype 6 montrent une sensibilité du virus au traitement antiviral chez 50 à 80% des patients (**Fung et al., 2008**), similaire à celle des patients infectés par un virus de génotype 2 ou 3.

Une étude récente a montré que le taux de réponse au traitement pouvait être le reflet de l'évolution du virus pour s'adapter au système immunitaire. L'étude phylogénétique réalisée avec tous les génomes complets disponibles (n=345) a abouti à la construction d'un arbre qui montre l'âge relatif des génotypes. La réponse au traitement observée dans des essais cliniques prospectifs a été reliée à cet arbre et a montré une corrélation entre le taux de réponse au traitement et l'âge des génotypes respectifs (**Pang et al., 2009**). Le génotype 2 du HCV serait le génotype le plus ancien, les génotypes 1 et 4 du HCV seraient les génotypes les plus jeunes et les génotypes 3, 5 et 6 du HCV seraient intermédiaires. Cette étude a également montré que les protéines E2 et NS5A pourraient être des déterminants clés de la réponse virale génotype spécifique. La divergence des génotypes du HCV aurait été fortement orientée d'une part par la pression de sélection du système immunitaire et d'autre part par l'acquisition de facteurs viraux, capables d'inhiber la réponse immunitaire et jouant un rôle dans la capacité à répondre à un traitement par interféron.

Le génotype du VHC reste à ce jour le principal facteur prédictif de réponse mais des facteurs de l'hôte pourraient avoir la même importance, comme le montre les

données récentes sur l'IL-28 pour les virus de génotype 1 (**Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009**).

4. Les outils de diagnostic et de monitoring biologique du VHC

4.1. Les techniques de diagnostic

Le diagnostic virologique, à partir du sérum ou du plasma de patients, repose sur des tests directs (biologie moléculaire), permettant la détection d'ARN VHC et des tests indirects (sérologique), permettant la détection d'anticorps anti-VHC (**Chevaliez and Pawlotsky, 2007**).

Les tests sérologiques utilisés sont basés sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques de troisième génération (EIAs), qui permettent de détecter des anticorps dirigés contre les différents génotypes du VHC (**Chevaliez and Pawlotsky, 2007**). Ces anticorps sont détectables à partir de sept à huit semaines après l'infection. La spécificité des tests EIAs de troisième génération est supérieure à 99% (**Chevaliez and Pawlotsky, 2007**). En général, si le résultat est positif ou douteux il faut le confirmer par la détection de l'ARN viral.

Les tests moléculaires reposent sur la détection de l'ARN du VHC. Ce test peut se faire dès le septième jour après l'infection. Ces méthodes de biologie moléculaire incluent des tests qualitatifs (bDNA), pour la détection d'ARN viral présent dans les fluides corporels, et des tests quantitatifs (RT-PCR), pour la détermination de la charge virale (**Chevaliez and Pawlotsky, 2007**).

4.2. Les techniques de suivi virologique

La charge virale ARN du VHC peut être quantifiée par des techniques d'amplification d'une région cible (PCR classique ou PCR en temps réel), ou des techniques d'amplification de signal : ADN branché (bDNA). Plusieurs techniques commerciales sont maintenant disponibles (**Chevaliez and Pawlotsky, 2007**) :

- Quatre autres plateformes basées sur l'amplification par PCR en temps réel : la technique cobas® TaqMan HCV, qui peut être couplée à un extracteur automatisé, le Cobas Ampliprep® (CAP-CTM, Roche Molecular Systems), la plateforme Abbott RealTime™ VHC (Abbott Diagnostics), qui utilise le système Abbott m2000rt peut également être couplée à un automate

extraction automatisé, le m2000sp (système de PCR en temps réel m2000), Artus HCV QS-RGQ assay (Qiagen) et VERSANT HCV RNA 1.0 assay (kPCR, Siemens) qui peuvent également être couplés à un extracteur automatique.

- Une plateforme basée sur la technologie bDNA, Versant® ARN du VHC 3.0 Assay (Siemens)

4.3. Les techniques de typage génomique

Le typage génomique est la méthode la plus courante pour déterminer le génotype. Les techniques utilisées ne sont pas toutes équivalentes, certaines notamment sont plus discriminantes que d'autres pour déterminer les sous-types. Les plus utilisées actuellement sont :

- La technique **d'hybridation inverse ou LiPA** (line Probe Assay) qui s'appuie sur l'analyse du polymorphisme de la région 5'NC dans la première version et sur l'analyse des régions 5'NC et core dans la version 2 (**Verbeeck et al., 2008**).
- Le **séquençage direct suivi d'une analyse phylogénétique** : plusieurs régions du génome viral ont été étudiées en vue de caractériser les souches du HCV. Les séquences obtenues sont comparées à des séquences de référence répertoriées dans des banques de données telles que Los Alamos HCV (**Kuiken et al., 2005**), euHCV database (**Combet et al., 2007**) ou GenBank. La construction d'arbres phylogénétiques incluant les séquences de référence permet de déterminer le génotype voire même le sous-type, selon les régions amplifiées. La région 5'NC est extrêmement conservée et ne permet pas de discriminer tous les sous-types. L'analyse d'un fragment de la région NS5B semble être la meilleure approche pour déterminer à la fois le génotype et le sous-type de façon pertinente (**Murphy et al., 2007; Sandres-Saune et al., 2003**). Il existe aussi une technique de séquençage semi-automatisé basée sur l'amplification et le séquençage de 222 bp de la région 5'NC. La séquence obtenue est ensuite automatiquement comparée à des séquences de références (**Halfon et al., 2001**). Plus récemment, une méthode de séquençage d'un fragment de la région core avec interprétation

automatique du génotype et du sous-type a été développée permettant la détermination du sous-type dans 96% des cas (**Ross et al., 2008b**).

- Les techniques de **PCR en temps réel** utilisant des sondes spécifiques de génotype ou de sous-type ciblant soit la région 5'NC soit la région NS5B (**Martro et al., 2008; Nakatani et al., 2010**). L'analyse est limitée aux génotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5 et 6.
- Les techniques sur **puces à ADN** basées sur l'analyse la région 5'NC. Elles permettent de discriminer les sous-types 1a, 1b et d'identifier les différents génotypes (**Mao et al., 2010; Park et al., 2010**).

2^{ÈME} PARTIE

CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

Chapitre 3 : Méthodologie

1. Contexte

1.1. Informations générales sur le Sénégal

La République du Sénégal est située dans la partie la plus occidentale du continent Africain dans la zone soudano sahélienne comprise entre 12°8 et 16°41 de latitude Nord et 11°21 et 17°32 de longitude Ouest. D'une superficie de 196.722 km², il est limité au Nord par la Mauritanie, au Sud par la République de Guinée et la Guinée Bissau, à l'Est par le Mali et à l'Ouest par l'Océan Atlantique. Le Sénégal compte des circonscriptions administratives (14 régions, 45 départements et 117 arrondissements) et des collectivités locales (45 départements et 557 communes) (<http://www.au-senegal.com/les-regions-du-senegal,3605.html>)

En 2011, sa population était estimée à 12 855 153 habitants avec un taux d'accroissement moyen annuel de 2,79%. En d'autres termes, cette population augmente de plus de 900 personnes par jour. Le nombre de femmes est légèrement plus élevé que celui des hommes, avec 6 506 575 femmes (50,6%) contre 6 348 578 hommes (49,4%). Cette population croît rapidement, avec un indice de fécondité de 5 enfants par femme. La population est relativement jeune : 42,6 % ont moins de 15 ans. Les personnes en âge d'activité représentent 53,8% et celles âgées de 60 ans et plus constituent 5,2%. (http://www.ansd.sn/publications_SES.html) (site consulté en avril 2013). Les taux de natalité et de mortalité sont respectivement : 36,19 naissances pour 1.000 habitants et 9,05 décès/1.000 habitants (http://www.indexmundi.com/fr/senegal/population_profil.html).

1.2. Situation sanitaire

Le système de santé du Sénégal se présente sous forme de pyramide à 3 niveaux. Il est composé des structures publiques suivantes : 25 hôpitaux dont 24 fonctionnels, 76 districts sanitaires, 89 centres de santé, 1.240 postes de santé, 129 maternités, 2.098 cases de santé, 06 établissements publics de santé non hospitaliers. Outre ces structures publiques, le système de santé sénégalais comprend 555 cabinets médicaux privés, 37 cliniques privées, 570 cabinets para médicaux privés, 23 structures d'entreprise et 77 postes de santé privés. Cependant, en termes de couverture en infrastructures sanitaires, le Sénégal n'a pas encore atteint les normes préconisées par l'OMS (http://www.cnls-senegal.org/pdf/PSN_2011-2015.pdf). Il y a

un centre de santé pour 165.878 habitants, ce qui est largement supérieur à la norme de l'OMS qui recommande 1 centre de santé pour 50.000 habitants). (<http://www.keewu.com/article320.html>).

1.3. Situation épidémiologique du VIH/SIDA

Les données épidémiologiques sur l'infection à VIH sont issues du programme de surveillance sentinelle couvrant plusieurs sites dans le pays depuis 1989. Ce programme a pour mission d'établir les prévalences annuelles de l'infection à VIH et de la syphilis, mais aussi de donner les tendances évolutives et de faire des estimations. Il ciblait différents groupes de populations choisis en fonction de leur vulnérabilité à savoir les hommes porteurs d'infections sexuellement transmissibles (IST), les malades hospitalisés dans les services de médecine et de maladies infectieuses, les tuberculeux, les femmes enceintes et les travailleuses du sexe. Ce programme, qui s'est étendu à l'ensemble du territoire national, a évolué en intégrant la surveillance comportementale par le diagnostic des IST à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce programme de surveillance ont permis de classer le Sénégal en pays à épidémie concentrée selon la classification de la Banque Mondiale et de l'ONUSIDA, avec une prévalence faible de 0,9% en 2011 chez les femmes enceintes (Conseil National de lutte contre le SIDA, 2013). Dans le groupe vulnérable des travailleuses du sexe, cette prévalence était de 20% en 2009 (Conseil National de lutte contre le SIDA, 2012). Cependant il existe une disparité au niveau régionale, les régions du sud du pays étant les plus touchées par l'épidémie.

1.4. Situation épidémiologique du VHC

Le Programme National de Lutte contre les Hépatites (PNLH) est l'organe national de coordination et d'appui de l'ensemble des activités relatives à la lutte contre les hépatites dans le cadre de l'exécution du plan stratégique national. Il assure le suivi et l'évaluation de la mise en œuvre des activités aux différents niveaux d'exécution. Les objectifs généraux du programme surtout en ce qui concerne le virus de hépatite C (VHC) sont la réduire de l'incidence des hépatites C, la diminuer de la morbidité et de la mortalité attribuables au VHC et le maintenir en dessous de 2% la prévalence

de l'infection par le virus de l'Hépatite C dans la population générale (<http://www.hepatites.sn/le-pnlh/presentation.html>). Toutefois, le dépistage du virus de l'hépatite C ni systématique ni gratuite dans les structures de santé. Il n'existe donc pas données épidémiologiques régulières au niveau national pour l'infection à VHC issues du programme même si des données de séroprévalences au niveau des donneurs de sang et des usagers de drogue ont été documentées.

2. Justificatifs de la thèse

Les pandémies du VIH et du VHC sont caractérisées par la circulation de plusieurs sous-types génétiques et des formes recombinants entraînant ainsi une grande diversité génétique qui ne cesse d'augmenter avec des doubles infections entre les sous types mais également des co-infections entre les virus (VIH, VHB et VHC). Cette variabilité génétique est impliquée dans le diagnostic, le monitoring virologique, la réponse au traitement et la recherche vaccinale. L'évaluation de cette grande diversité génétique est donc nécessaire pour assurer un diagnostic et un suivi optimal des personnes vivant avec le VIH et/ou VHC. Si le diagnostic et le suivi des PVVHC n'est pas encore effectif au niveau du programme, le diagnostic du VIH est essentiellement basé sur des tests sérologiques. Mais pour les enfants nés de mères séropositives, c'est le diagnostic moléculaire qui est effectué du fait de la persistance des anticorps maternels. Et le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) se fait par la détermination du taux de CD4 qui permet l'initiation du traitement antirétroviral lorsque le taux de CD4 est inférieur à 500 cellules/ μ l de sang (WHO, 2013) et avec les dernières recommandations de l'OMS (WHO, 2015), l'initiation du traitement se fait quelle que soit le taux de CD4. L'évaluation de l'efficacité du traitement antirétroviral se fait par la quantification de la charge virale plasmatique grâce à des plateformes de biologie moléculaires qui est devenue une recommandation forte de l'OMS depuis 2013.

Au Sénégal, la gratuité des ARVs et leur décentralisation ont permis d'accroître le nombre de PVVIH sous traitement antirétroviral. En fin 2011, le conseil national de lutte contre le SIDA (CNLS) estime à 18 352 le nombre de sénégalais vivant avec le VIH recevant un traitement antirétroviral avec 62% dans les régions et 38% dans la capitale. Après 10 ans de circulation d'ARV au Sénégal et malgré les efforts réalisés dans l'accès aux soins, la décentralisation des techniques moléculaires de diagnostic et de monitoring n'est pas encore effective.

C'est ainsi que nous nous sommes fixé comme objectif général d'étudier la diversité génétique du VIH-1 et du VHC et de comparer les techniques moléculaires de diagnostic et de monitoring du VIH-1

Ces travaux de thèse ont été subdivisés en quatre objectifs spécifiques de recherche

Objectif 1 : Décrire la diversité génétique et les phénomènes de doubles infections du VIH-1 dans le groupe spécifique des hommes qui ont des rapports sexuels avec les hommes

Objectif 2 : Décrire la diversité génétique du VHC par une étude pilote, une première du genre dans le groupe des usagers de drogue avec le papier buvard comme support de prélèvement dans le contexte de pays à ressources limitées.

Objectif 3 : Evaluer les performances de NucliSens EasyQ v2.0[®] (Biomérieux) par rapport à la technique de diagnostic Amplicor HIV-1 DNA test[®], v1.5 des laboratoires de Roche qui est la technique de référence pour le diagnostic.

Objectif 4 : Comparer quatre techniques commerciales de charge virale dans une zone de circulation des sous-types non B

3. Cadre de l'étude

Ces travaux ont eu comme cadre d'étude l'unité de Biologie Moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie au CHN A. Le Dantec à Dakar (Sénégal) et le laboratoire de Virologie de l'hôpital Saint Antoine de Paris.

Le laboratoire de bactériologie-virologie de l'HALD est le centre de référence national pour le diagnostic du SIDA et des IST. Il est également le laboratoire de référence OMS pour le VIH et centre collaborateur ONUSIDA. Le laboratoire est partenaire de plusieurs projets sur la résistance aux antirétroviraux. Ce laboratoire contient en son sein l'unité de biologie moléculaire et est équipé de technologie moléculaire de diagnostic précoce, de plusieurs plateformes pour la quantification de la charge virale et de deux séquenceurs 4 et 16 capillaires (Applied Biosystems). Ce qui fait de l'unité de Biologie Moléculaire le laboratoire chargé sur le plan national du diagnostic précoce du VIH et de la charge virale.

Les travaux que nous avons menés reposent sur 4 objectifs spécifiques qui ont chacun fait l'objet de publication. Ainsi nous allons présenter séparément les différentes méthodologies adoptées, les résultats obtenus et la discussion avant de faire une synthèse des travaux dans la partie conclusion générale.

4. La Méthodologie utilisée

Pour décrire la diversité génétique du VIH et du VHC nous avons utilisé deux groupes à risque dont celui des Hommes qui ont des rapports Sexuels avec des Hommes (HSHs) et le groupe des usagers de drogues injectables pour respectivement le VIH le VHC. Pour le VIH, la diversité génétique a été mise en évidence par la MHA et par analyses phylogénétiques des gènes *gag* et *vpu* qui ont également permis d'étudier la fréquence des infections multiples. Et pour le VHC, les génotypes ont été déterminés par la technique Versant[®] HCV génotype et la technique Abbott Genotyping qui sont toutes les deux techniques commerciales. La méthodologie des deux travaux a été décrite ci-dessous.

4.1. Détermination de la fréquence élevée de multiples infections du VIH-1 avec des sous-types et CRFs différents ou identiques chez les HSHs au Sénégal

• Populations d'étude

Pour étudier la diversité génétique et la fréquence élevée des infections multiples pour cette étude rétrospective nous avons utilisés des prélèvements de HSHs (Hommes qui ont des rapports sexuels avec des Hommes) au nombre de 67 provenant de quatre villes du Sénégal: Dakar, Mbour/Thiès et Saint-Louis. Ils ont été recrutés dans le cadre de l'enquête ELIHoS de surveillance socio-épidémiologique de 2007, ciblant ces HSHs au Sénégal. Leur recrutement avait été réalisé par effet boule-de-neige.

• Détection avec la MHA des doubles infections

Compte-tenu des variants circulants au Sénégal, nous avons utilisé la méthode MHA (Multi Hybridization Assay) et qui permet de discriminer 5 sous-types et 3 CRFs différents (A, B/D, C, F, G, CRF02_AG, CRF06_cpx et CRF22_01A1) circulant en Afrique de l'Ouest et du Centre-Ouest (Vidal *et al.*, 2013). L'extraction de l'ADN viral a été réalisée à partir des Cellules Mononucléées du Sang périphérique (PBMC) avec le kit QIAmp Viral DNA extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Pour la technique MHA : Un premier round d'amplification avec les amorces externes a été réalisé pour chacune des deux régions *gag* (G00-G25) et *vpu* (MHVPU1 et MHVPU2) du génome. Un deuxième round de PCR en temps réel sans sonde a été réalisé à partir des premiers rounds. Les amorces internes utilisées dans cette étape

sont pour *gag* p17 le couple MHgag5-MHgag6 et MHVpu3-MHVpu4 pour *vpu*. Ces amorces permettent d'amplifier des petits fragments compris entre 180 et 220 nucléotides. L'amplification en temps réel a été effectuée sur l'appareil de PCR ABI Prism 7000. Les résultats des PCR ont été visualisés sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, pour vérifier la présence et la taille des produits de PCR attendus. Par la suite, un deuxième round de PCR en temps réel a été réalisé de façon séparée en présence de chacune des treize sondes marquées YakimaYellow-BHQ1 pour *gag* et des 12 autres marquées Fam-Tamra pour *vpu*. Les résultats de fluorescence des sondes ont été visualisés directement avec l'ordinateur relié à l'appareil de PCR en temps réel. Pour les MHA réalisées dans la région *gag* p17, le Sybr green a permis de visualiser sur l'ordinateur la présence d'ADN amplifié, même en cas de réponse négative à la sonde testée. Pour *vpu* les sondes Fam-Tamra ont une longueur d'onde qui n'est pas dissociable de celle du Sybr Green. Dans ce cas, la présence d'ADN amplifié a été vérifiée sur toutes les réponses négatives en sonde sur un gel d'agarose.

Tous les échantillons répondant positivement à plus d'une sonde ont été repris en MHA pour les sondes concernées afin de s'assurer des réponses obtenues initialement. Par ailleurs, 10% des échantillons ont été repris de manière aléatoire pour réaliser un contrôle de qualité en interne.

- **Confirmation par séquençage des gènes *gag* p17 et *vpu***

Pour la confirmation des réponses obtenues en MHA, le séquençage et l'analyse phylogénétique des gènes *gag* p17 et *vpu* ont été réalisés. Pour *vpu*, les séquences ont été directement obtenues à partir des produits de la PCR en temps réel et utilisent les mêmes amorces internes. Pour les séquences *gag* p17, à partir des premiers rounds, nous avons effectué un deuxième round de PCR classique avec les amorces MHgag1-MHgag4. Le produit obtenu a une taille plus importante (416 paires de bases) qui permet une meilleure analyse phylogénétique que le produit initialement généré avec le couple d'amorces MHgag5-MHgag6 (221pb) utilisées pour la MHA.

4.2. Détermination de la diversité génétique du VHC chez les usagers de drogue

- **Recrutement des participants et confection des papiers buvard**

Pour le recrutement des participants, c'est la méthode RDS (Respondant Driven Sampling) qui a été utilisée (Burt and Thiede, 2014). Les usagers de drogue (UD)

vivant dans la région de Dakar et qui ont déclaré avoir utilisé au moins une fois de la drogue (héroïne et/ou cocaïne) le trimestre précédent l'enquête et âgés d'au moins 18 ans ont été inclus dans l'étude. Au total, 506 participants ont été recrutés entre le 19 Avril et le 15 Juillet 2011 et le papier buvard (ou DBS) a été utilisé comme support de prélèvement. Après séchage, les DBS ont été conservés à +4°C dans des sacs en plastiques scellables en présence de dessiccants et un indicateur d'humidité jusqu'à la réalisation des tests sérologiques. Après réalisation des tests sérologiques, les DBS étaient conservés à - 80°C jusqu'à réutilisation pour les techniques moléculaires. Un questionnaire comportemental est également administré aux participants.

- **Les tests sérologiques**

Les tests sérologiques ont été effectués pour tous les participants en utilisant les tests rapides. Le dépistage du VIH a été réalisé avec le kit HIV-1/2 Determine® Ag/Ab Combo (Matsudo-shi Medical Co. Alere, Matsuhidai, Chiba, Japan) et les tests positifs sont confirmés avec la trousse ImmunoComb® II HIV1 & 2 BiSpot kit (Orgenics, Yavne, Israel). La sérologie du VHC était réalisée avec le kit VEDALAB-HCV-CHECK-1® (VEDA LAB, Alencon, France) et la sérologie du virus de l'hépatite B avec le kit HEP-CHECK-1 (VEDA LAB, Alencon, France).

Pour les participants qui ont des sérologies VHC positives, la charge virale ont été effectuée avec la technologie Abbott RealTime HCV® et les tests de génotypage ont été réalisés avec les kits VERSANT HCV® et Abbott RealTime HCV Genotype II®.

- **Extraction des acides nucléiques**

Pour les tests moléculaires, deux spots de DBS d'environ 50 µl chacun ont été mis dans 2,5 ml de tampon de lyse Abbott (kit sample préparation, laboratoires Abbott Wiesbaden, Germany), puis vortexés pendant 15 secondes, ensuite agités doucement pendant 1 heure 45 minutes à 37°C, et enfin centrifugés pendant 5 minutes à 3000trs/min avant la récupération du surnageant dans des tubes de 1,5 ml. L'extraction des acides nucléiques a été réalisée avec l'automate M2000sp (Abbott, Wiesbaden, Allemagne) aussi bien pour la détermination de la charge virale que pour les génotypages par Versant® HCV Genotype (Innogenetics NV, Gent, Belgique) et par Abbott Genotyping (Abbott, Wiesbaden, Allemagne).

Des aliquots de 800 µl d'éluat de DBS sont chargés dans l'automate avec une prise d'essai de 500 µl selon les instructions du fabricant. A partir de l'ARN extrait, 50 µl ont été utilisé pour la charge virale et 10 µl pour le génotypage Inno LiPA.

Pour le génotypage Abbott une autre extraction a été réalisée dans les mêmes conditions et 50 µl ont été utilisés pour la détection des génotypes.

- **Quantification de la charge virale plasmatique par Abbott RealTime HCV**

L'élution des acides nucléiques des DBS était réalisée sous agitation dans 2,5 ml de tampon de lyse d'Abbott. L'extraction de l'ARN viral se faisait à partir de 1 ml de ce tampon de lyse (automate m2000sp). Un contrôle interne (IC) dérivé du gène hydroxypyruvate reductase de la citrouille était introduit dans le tampon de lyse. Ensuite une étape de retro-transcription et d'amplification de la région 5'NC du génome du VHC et du contrôle interne étaient réalisées (thermocycleur m2000rt) avec des sondes spécifiques (Taqman)

- **Génotypage par Versant HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)**

Les tests VERSANT HCV version 2.0 (Innogenetics NV, Gent, Belgique) étaient réalisés à partir de 5 µl d'ARN extrait sur l'automate d'Abbott (m2000sp) et utilisés selon les recommandations du fabricant. Le génotypage InnoLiPA repose sur le principe d'hybridation inverse après une amplification dans lequel les produits de PCR biotinylés ADN sont hybridés à des sondes oligonucléotidiques immobilisées qui sont spécifiques pour les UTR 5' et les régions de base des six génotypes de VHC. Les limites de détection décrites dans le manuel utilisateur sont 2106 UI / ml à $> 7,7 \cdot 10^6$ UI / ml.

- **Génotypage Abbott :**

Le kit Abbott RealTime HCV Genotype II (Abbott, Wiesbaden, Allemagne) utilise quatre paires d'amorces PCR dont la paire d'amorces IC (pour le contrôle interne) qui amplifie une portion du gène *hydroxypyruvate* réductase provenant de la citrouille, *Cucurbita pepo*. Le kit Abbott détecte les génotypes 1 à 6 et la limite inférieure est de 500 UI/ml.

Pour la comparaison des techniques moléculaires ce sont les plateformes Nuclisens Easy et Amplicor HIV-1 qui ont été utilisées pour le diagnostic et les techniques commerciales Abbott, Cobas Taqman, Biocentric et Nuclisens qui ont été utilisées pour la charge virale. Deux travaux ont été entrepris et les méthodologies sont présentées ci-dessous.

4.3. Evaluation des performances de NucliSens EasyQ v2.0[®] (Biomérieux) par rapport à la technique de diagnostic Amplicor HIV-1 DNA test[®], v1.5 des laboratoires de Roche

- **Echantillonnage et séparation lymphocytaire**

Pour l'évaluation des performances de la technique Nuclisens, un total de 192 échantillons de sang a été prélevé chez 101 enfants nés de mères séropositives. Parmi ceux-ci, 99 enfants étaient dans le programme PTME et âgés entre 3 semaines et 18 mois et 2 enfants qui sont âgés de plus de 24 mois et qui avaient des sérologies répétées indéterminées au VIH. Deux types d'échantillons ont été prélevés, du sang total dans des tubes d'EDTA (Ethylène diamine tétra acétique) et des DBS. Les échantillons de sang veineux (n=43) ont été prélevés à l'Hôpital d'Enfant Albert Royer (hôpital de référence pour les enfants) et les DBS (n=149) ont été recueillis sur les sites de PTME dans la banlieue de Dakar et trois autres villes du Sénégal (Mbour, Joal et Thiés).

Les prélèvements de sang total sur tube EDTA et les prélèvements de DBS ont été réalisés selon les procédures en vigueur dans les sites en respectant les bonnes pratiques de laboratoire pour les tests de diagnostic. Les prélèvements seront acheminés dans les 3 heures au laboratoire et la séparation lymphocytaire se fera au niveau du laboratoire de Bactériologie Virologie

Les PBMC ont été gardés à -20°C et les DBS à températures ambiantes jusqu'à manipulations. Les tests Amplicor et Nuclisens sont présentés ci-dessous.

- **La technologie Amplicor HIV-1 DNA test[®], v1.5 des laboratoires de Roche**

Le test Amplicor HIV-1 DNA Test, Version 1.5 est un test qualitatif pour la détection d'ADN du VIH-1 dans le sang humain. Le test est basé sur l'amplification par PCR d'une séquence de 155 pb du gène gag suivie d'une détection par hybridation de sondes spécifiques en présence d'un contrôle interne. Tout d'abord, une étape de préparation des échantillons est réalisée par lavage d'un spot de DBS coupés en présence de détergent suivie dans de l'extraction de l'ADN viral à chaud. Après l'amplification par PCR, une détection de l'ADN viral et du contrôle interne est réalisée séparément après une dénaturation chimique. La fixation d'un conjugué marqué à l'Avidine peroxydase permet la lecture de l'absorbance à une longue d'onde de 450 nm.

- **La technologie NucliSens EasyQ HIV v1.1[®] des laboratoires Biomérieux**

La technologie de NucliSens EasyQ permet la quantification de l'ARN viral par amplification-détection d'une séquence cible du gène *gag* selon les instructions du fabricant (BioMérieux, Lyon, France). Brièvement, un volume de sang sera prélevé

ou 2 spots de sang seront coupés à l'aide d'un puncher et plongé dans le Lysis Buffer contenant du thiocyanate de guanidine et du Triton X-100 et une concentration déterminée de calibrateur synthétique. L'extraction se fait sur le NucliSens EasyMAG selon le principe de la technique de Boom grâce à de particules de silice magnétique ajoutées au lysat. Une amplification de type NASBA de l'ARN viral et du contrôle interne se feront simultanément sur l'automate de Biomérieux avant la détection en temps réel à l'aide de balises moléculaires.

4.4. Comparaison de quatre techniques commerciales de charge virale dans une zone de circulation des sous-types non B

- **Echantillonnage**

Pour cette étude, deux poches de sang provenant du centre national de transfusion sanguine (CNTS) et 123 prélèvements sur tubes d'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ont été effectués sur des patients du programme national de lutte contre le SIDA (CNLS) pour la comparaison entre les plateformes de charge virales. La séparation lymphocytaire a été effectuée dans les 4 heures qui suivent les prélèvements et les aliquots de plasmas ont été conservés à -80°C jusqu'à réalisation des tests. La quantification virale pour chaque plateforme a été effectuée conformément aux instructions du fabricant et présentée ci dessous.

- **Quantification de la charge virale du VIH-1**

Cette étude a été réalisée en deux étapes : Une première étape de vérifier des performances de la technologie d'Abbott (m2000sp/rt) considérée comme technique de référence à l'aide de prélèvements de plasmas VIH-1 de donneurs de sang. La deuxième étape consistait à comparer la charge virale de quatre plateformes (m2000sp/rt, EasyQ, GENERIC et CAP-CTM).

- ✓ **La technologie Abbott RealTime HIV-1 ® (m2000sp/rt)**

Abbott Real Time HIV-1 assay (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Germany) est un test in vitro d'amplification par RT PCR en temps réel de l'ARN viral ciblant la région de l'intégrase du gène pol hautement conservé grâce à une sonde d'hybridation. L'amplification est couplée à la détection en temps réel utilisant une sonde partiellement double brin marquée. Ce test détecte les VIH -1 groupes M, N, O et P et plusieurs CRF (**Church et al., 2011**). L'extraction entièrement automatisée a été réalisée sur 600 µl de plasma avec l'automate Abbott m2000sp et l'amplification

suivie d'une détection en temps réel avec l'analyseur Abbott m2000rt. Les limites de détection de la technique sont de 1.60 à 7.0 log₁₀ copies/ml.

✓ **La technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 v2.0 ® (EQ)**

NucliSENS EasyQ v2.0 (BioMérieux, Lyon, France) effectue une amplification isothermique de l'ARN viral grâce à une balise moléculaire (NASBA) ciblant le gène gag du VIH-1. L'extraction est effectuée sur 200µl de plasma en utilisant l'automate NucliSens EasyMAG. L'amplification NASBA et la détection en temps réel sont effectuées sur l'automate EasyQ. Un contrôle interne est simultanément extrait et amplifié dans les mêmes conditions que les échantillons. Cette technique détecte le groupe M du VIH-1 et de plusieurs CRFs (**de Baar et al., 2001**). Les limites de détection de la technique sont de 1.3 à 7.0 log₁₀ copies/ml.

✓ **Technologie Cobas Ampliprep/TaqMan V2.0 ® (CAP-CTM)**

COBAS AmpliPrep/Cobas TaqMan test VIH-1 v2.0 (Roche Molecular Diagnostics, Bale Suisse) permet l'amplification en temps réel par RT-PCR ciblant des régions hautement conservées du gène gag et la région LTR utilisant une sonde TaqMan. COBAS TaqMan utilise un contrôle interne simultanément extrait et amplifié avec chaque échantillon. Ce test détecte les groupes M, O, P et plusieurs CRFs (**Church et al., 2011**). L'extracteur automatique COBAS Ampliprep a été utilisé pour extraire l'acide nucléique à partir de 1000µl de plasma. L'amplification et détection en temps réel ont été réalisées à l'aide de l'automate COBAS TaqMan 48 avec des limites de détection de 1.3 à 7.0 log₁₀ copies/ml.

✓ **La technologie générique VIH-1 (GEN)**

Le test Generic HIV Charge virale (Biocentric, Brandol, France) utilise le principe de RT-PCR ciblant une région conservée du génome LTR du VIH-1. La détection est faite à l'aide d'une sonde TaqMan. Le test quantifie les groupes M, O et plusieurs CRFs (**Rouet et al., 2010**). Une extraction manuelle de l'ARN sur colonne à partir de 200µl de plasma a été effectuée avec le kit Qiagen® (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). L'amplification a été réalisée sur ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le Kit Biocentric utilise un étalon externe et les limites de détection de l'essai sont de 2.48 à 7.0 log₁₀ copies / ml.

- **Génotypage et l'analyse phylogénétique**

Les échantillons qui présentaient des discordances et dont la charge virale était supérieure à 3.0 log ont été génotypés sur les gènes *gag* et *pol*. Pour le gène *pol*, La totalité du gène de la protéase et les 240 premiers acides aminés du gène de la RT ont été amplifiés par une RT-PCR nichée (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Pour le gène *gag*, une partie de la région p24 ont été amplifiées comme précédemment décrites (Toure-Kane et al, 2000). Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit (Qiagen, Valencia, Espagne) et séquencés directement sur le séquenceur ABI 3100-Avant en utilisant l'enzyme BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les séquences générées ont été corrigées à l'aide du logiciel SeqMan II™ de DNASTar v.5.08 (Lasergene, Madison) Les alignements et la reconstruction phylogénétique ont été réalisés avec les logiciels Clustal X version 1.83 et Seaview 4.4.1 en utilisant la méthode du plus proche voisin ou Neighbor-Joining (NJ). Tous les sous-types purs et CRF circulant en Afrique de l'Ouest disponibles sur la base de données de Los Alamos ont été inclus dans l'analyse. Pour déterminer si un virus était recombinant ou non, l'analyse de similarité et le bootscanning a été réalisée avec la version 3.5.1 du logiciel Simplot.

L'analyse des différences de polymorphisme a été réalisée sur les séquences de CRF02_AG qui ont montré des résultats discordants entre les différentes plateformes. Les séquences ont été analysées en utilisant SeqPublish and Sequences locator de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). La séquence HXB2 (accession no. KO3455) et quelques CRF02_AG du Sénégal de GenBank ont été ajoutées comme séquences de référence et alignées.

CHAPITRE 4 :

RÉSULTATS

CHAPITRE 4 : Analyses des résultats

Les différentes méthodologies adoptées nous ont permis d'obtenir les résultats suivants et qui seront présentés en sous chapitre selon les objectifs spécifiques prédéfinis. Ainsi pour la diversité génétique et les évaluations des plateformes moléculaires de diagnostic et de charge virale, les résultats sont respectivement les suivants :

1. Détermination de la diversité génétique et de la fréquence élevée de doubles infections du VIH-1

• Détection avec la MHA des doubles infections

Parmi les 69 HSHs traités en MHA, 55/69 (79,7%) étaient positifs en sonde en *gag* p17 et 59/69 (85,5%) en *vpu*. 12 (17,4%) échantillons étaient réactifs seulement avec les sondes *vpu* et 8 (11,6%) étaient seulement réactifs avec les sondes *gag* et 2 (2,9%) n'étaient pas réactifs sur les deux sondes. Les deux échantillons négatifs sur MHA ont été caractérisés comme étant CRF09_cpx ou comme des recombinants C/CRF09_cpx. Les 12 échantillons réactifs seulement avec les sondes *vpu* étaient identifiés comme CRF02_AG (n = 3), sous-type B/D (n = 2), sous-type C (n = 6) and sous-type G (n = 1). Les 8 échantillons réactifs seulement sur *gag* étaient identifiés comme CRF02_AG (n = 3), sous-type C (n = 2), sous-type G (n = 1) et 2 échantillons étaient réactifs simultanément avec plusieurs sondes (*gag22+gagA* et *gag22+gagA+-gagB/D*).

Un total de 47 (68,1%) étaient positifs en MHA sur les deux gènes *gag* et *vpu*. Parmi ces derniers, 22 (46,8%) étaient du sous-type C, 9 (19,1%) des CRF02_AG, 4 (8,5%) étaient des URF, 1 (2,1%) du sous-type B/D, et 11 (23,4%) avaient réagi simultanément avec des sondes hétérologues et étaient considérés comme doublement infectés, soit 15,9% (11/69) de l'ensemble des HSHs inclus. Les séquences de ces derniers ont montré que les doubles infections impliquaient les sous-types A, C, B/D, G, CRF02_AG, et CRF22_01A1.

Dans une étude précédente, sur la validation de nouvelle technique MHA, il a été rapporté, la combinaison de plusieurs sondes *gag* pour augmenter la sensibilité pour détecter le sous-type C. Ainsi, nous avons utilisé deux sondes nommés *gagC1* et *gagC1bis* spécifique pour les sous-types C de l'Afrique de l'Est et du Brésil et une autre sonde dénommée *gagC2*, qui est mieux adapté pour détecter les sous-types C provenant des autres régions géographiques (Afrique du Sud, Inde).

Dans notre étude, 29 échantillons ont été identifiés comme des sous-types C par MHA en gag. Parmi ces 29 échantillons sous-type C, 5 seulement ont réagi avec la sonde C1, 9 seulement avec la sonde C2 et 15/29 (51,7%) ont réagi à la fois avec les sondes C1 et C2. Sur les 15 échantillons doublement réactifs aux deux sondes, 11 séquences ont été comparées pour voir si cette double réactivité représente des doubles infections ou des réactions croisées. Pour 10 des 11 échantillons qui avaient réagi à la fois avec deux sondes C, seulement 1 ou 2 mismatches ont été observés avec la sonde de C2, contre 5 à 7 avec la sonde de C1. Un seul échantillon a montré 3 mismatches avec la sonde C2 contre 5 avec C1. Ces observations suggèrent que la majorité des échantillons réactifs avec les sondes C1 et C2 sont les plus susceptibles d'être des infections aux deux sous-types de C.

- **Confirmation par séquençage des gènes *gag p17* et *vpu***

La SGA et les dilutions d'ADN ont confirmé la double infection avec les sous-types D et C du HSH1193, la triple infection avec deux souches de C différentes et un CRF02_AG du HSH1157 et ont montré que le HSH3017 était infecté par au moins du CRF06_cpx, du CRF02_AG et une autre souche inclassable.

2. Détermination de la diversité génétique du VHC chez les usagers de drogue

Dans le mois précédant l'enquête, les drogues utilisées par les usagers de drogue étaient réparties comme suit : héroïne = 91,5%, cannabis = 64%, crack = 49,4%, alcool = 49%, benzodiazépines = 29,8% et cocaïne = 13,6%. La consommation de plus de trois drogues a été notée dans 291 (57,5%) UD. L'utilisation concomitante d'analgésiques tels que le paracétamol était fréquente (26,9%), et 27 patients ont signalé la consommation occasionnelle de substitution aux opiacés (méthadone).

Sur les 506 participants qui ont été inclus dans l'étude, 22 (4.3%) étaient positifs au VIH, 45 (8.9%) positifs au VHB et 120 (23.8%) positifs au VHC. La prévalence du VIH était significativement différente entre les UD qui se sont injectés au moins une fois dans la vie et ceux qui ne se sont jamais injectés avec 9.4% versus 2.5% ($p_{0.001}$), la prévalence du VIH était également différente entre les femmes et les hommes avec 13% versus 3% ($p_{0.001}$). La prévalence du VHC était aussi significativement différente entre les UD qui se sont injectés au moins une fois dans la vie et ceux qui ne se sont jamais injectés avec 38.85% versus 18% ($p_{0.0001}$). Le sexe

n'influe pas sur la prévalence du VHC (32.0% pour les femmes versus 22.9% pour les hommes, $p_{0.2}$) et du VHB (4.3% pour les femmes versus 9.6% pour les hommes, $p_{0.2}$).

La charge virale a été réalisée sur les 120 DBS positifs au test anticorps anti-VHC et 25 (20,8 %) ont présenté une charge virale détectable. La médiane de charge virale était de 150 580 UI/ml (CV comprise entre les extrémités 710 UI/ml et 766 740 UI/ml).

Les génotypes ont pu être déterminés avec la technique Inno LiPA sur les DBS à charges virales détectables et se répartissaient comme suit : le génotype 1 était majoritaire avec 21 des 25 détectables dont 16 génotypes 1a et 5 génotypes 1b, suivi du génotype 4 ($n= 2$) puis les génotypes 2AC ($n= 1$) et 3A ($n=1$).

Pour la recherche de double infection nous avons utilisée la technique de génotypage Abbott et sur les 12 génotypes réalisés, 1 seul cas de double infection entre sous type du VHC a été noté. La technique de génotypage Abbott présentait également 100% de concordance avec celle d'Inno LiPA, et ce sont toujours les génotypes 1 ($n=10$) qui sont retrouvé majoritaires (dont 6 génotype 1a, 3 du génotype 1b et 1 génotype 1a+b) suivit des génotypes 3 ($n= 1$) et 4 ($n= 1$).

3. Evaluation des performances de Nuclisens EasyQ v2.0® (Biomerieux) par rapport a la technique de diagnostic amplicor hiv-1 dna test®, v1.5 des laboratoires de roche

- **La comparaison à partir des buffycoat**

Parmi les 43 prélèvements de sang sur tube EDTA, l'ARN du VIH-1 a été détecté dans le plasma de 10 patients par le NucliSENS, et ces 10 patients ont aussi eu un résultat positif sur la technique de référence Amplicor en utilisant les buffycoat correspondant.

Le NucliSENS a montré une sensibilité et une spécificité de 100%. Les VPP et VPN étaient de 100%. Une parfaite concordance a été trouvée entre les deux plateformes en utilisant les prélèvements de sang total sur tube, avec un coefficient Kappa de 1 ($p<0,001$)

- **La comparaison à partir des DBS**

L'ARN du VIH-1 a été détecté par la technique NucliSENS sur 19 DBS qui avaient été détectables par la technique Amplicor. Il n'y a pas eu de prélèvement positif sur Amplicor et négatif sur le NucliSENS. Les analyses statistiques ont donné un coefficient Kappa de 1 ($p < 0,001$), montrant aussi une parfaite concordance entre les deux plateformes avec le DBS. La comparaison de performance entre le NucliSENS et l'Amplicor a montré une sensibilité de 100% (IC 95% : 79,1-100%), une spécificité de 100% (IC 95% : 96,4-100%), une VPP de 100% (IC 95% : 79,1-100%) et une VPN de 100% (IC 95% : 96,4-100%).

4. Comparaison de quatre techniques commerciales de charge virale dans une zone de circulation des sous-types non b

- **Analyse des performances d'Abbott RealTime (m2000sp/rt ; Abbott)**

La performance d'Abbott RealTime a été évaluée à l'aide de la répétabilité, la reproductibilité, d'incertitude, la justesse et la contamination.

Pour le test de répétabilité, les coefficients de variation (CoV) obtenus étaient de 1,35% [0,44 à 1,37], 0,65% [0,44 à 0,72], 0,54% [de 0,46 à 0,72] pour respectivement les concentrations basses, moyennes et les élevées.

Pour l'évaluation de la reproductibilité, les coefficients de variation suivants ont été obtenus : 2,36% [1,34-2,84] et 1,42% [1,32-1,44] pour respectivement les concentrations faibles et élevées.

Pour la justesse, les CoV étaient de 1,02% pour les valeurs faibles et de 0,20% pour les valeurs élevées. L'incertitude était de 0,14 aussi bien pour les valeurs faibles que pour les valeurs élevées. L'étude de la contamination était effectuée sur deux niveaux de concentrations (faible et élevée) et répétée 5 fois ont donné valeur de 0,94%.

- **Comparaison des résultats de la charge virale**

- **Comparaison entre m2000sp/rt et CAP-CTM**

Pour comparer les charges virales entre m2000sp/rt et CAP-CTM, 81 échantillons ont été testés sur les deux plateformes. Sur m2000sp/rt, 29 échantillons présentaient des CV indétectables et 52 des CV détectables (moyenne de CV = 4,03 log) et sur CAP-CTM 25 échantillons étaient indétectables et 56 détectables (moyenne de CV = 3,86 log). Trois échantillons détectables sur CAP-CTM étaient indétectables sur m2000rt/sp et 3 autres détectables sur m2000sp/rt ne l'étaient pas sur CAP-CTM.

Parmi les échantillons détectables sur les 2 plateformes, 3 présentaient des discordances avec 2 échantillons sous quantifiés par m2000sp/rt et 1 échantillon sous quantifié par et CAP-CTM. Une Bonne corrélation et concordance ont été retrouvées entre les deux plateformes avec une valeur de $R = 0.98$ et un biais = -0.00185.

- **Comparaison entre m2000sp/rt et EQ**

La comparaison entre ces 2 techniques a été effectuée sur 73 échantillons. Avec m2000sp/rt, la CV était indétectable sur 22 échantillons et détectable sur 51 échantillons (moyenne de 4.09 log copies/ml) et EQ avait présenté une CV indétectable sur 27 échantillons et détectable sur 46 échantillons (moyenne CV = 4.10 log copies/ml). Un échantillon était détectable par EQ et indétectable m2000sp/rt et 6 échantillons étaient détectés par m2000sp/rt et non par EQ. Les 7 échantillons présentaient une CV < 2.96 log copies/ml. Parmi 52 échantillons détectés par m2000rt/sp et/ou EasyQ, 20 présentaient une discordance de CV qui variait de 2 à 6 log copies/ml avec 5 sous quantifiés par m2000sp/rt et 15 échantillons sous quantifiés par EQ. Une bonne corrélation et concordance ont été retrouvées entre les deux plateformes avec $r^2 = 0.96\%$ et un biais = -0.144.

- **Comparaison entre m2000rt/sp et GEN**

Pour comparer ces 2 techniques, 123 échantillons ont été utilisés. Sur m2000sp/rt, 78 avaient des CV indétectables et 45 des CV détectables (moyenne de CV 4.39 log). Sur GEN, 67 échantillons étaient indétectables et 56 détectables (moyenne CV = 4.07 log). Quatorze (14) échantillons détectables sur GEN étaient indétectables sur m2000sp/rt et 3 détectables sur m2000sp/rt indétectables sur GEN. Sur 59 échantillons détectés par m2000sp/rt et/ou Biocentric, 13 présentaient des discordances parmi eux 6 échantillons étaient sous quantifiés m2000sp/rt et 7 échantillons sous-quantifiés GEN. Les tests de corrélation et de concordance ont montré entre les deux techniques une valeur de $r^2 = 0.95\%$ et un biais = 0.0147.

- **Comparaison EQ et GEN**

La comparaison des CV EQ et GEN a utilisé 73 échantillons. Sur EQ 32 échantillons étaient indétectables et 41 détectables (moyenne CV = 4.39 log copies/ml) et sur GEN 19 échantillons étaient indétectables et 54 détectables (moyenne CV =de 4.11 log copies/ml). Un échantillon était détectable sur EQ et indétectable sur GEN et 14

échantillons détectable sur GEN et indétectable sur EQ. Parmi les 54 échantillons avec des CV détectables sur EQ et/or GEN, 20 discordances ont été trouvées avec 6 échantillons sous quantifiés sur GEN et 14 échantillons sous quantifiés par EQ. Un coefficient de corrélation $r^2 = 0,90$ et un biais = -0.135 ont été trouvés entre les 2 techniques.

- **Comparaison des EQ et CAP-CTM**

Soixante douze (72) échantillons ont été testés sur les deux plateformes. Sur EQ, 27 échantillons étaient indétectables et 45 CV étaient détectables (moyenne de CV = 4.17 log copies/ml). Les échantillons testés sur CAP-CTM ont montré une indétectabilité sur 19 échantillons et une détectabilité sur les 52 autres (moyenne CV=3.94 log copies/ml). Un échantillon détectable sur EQ était indétectable par CAP-CTM et 9 détectables par CAP-CTM étaient indétectables sur EQ. Parmi les échantillons avec des CV détectables sur EQ et/ou CAP-CTM, 17 présentaient des discordances avec 5 et 12 échantillons sous quantifiés respectivement par CAP-CTM et EQ. Les tests de corrélation et de concordance ont montré entre les deux techniques une valeur de $r^2 = 0.95$ et un biais = -0.122.

- **Comparaison des CAP-CTM et GEN**

La comparaison des 2 techniques a porté sur 81 échantillons. Avec CAP-CTM, 38 échantillons étaient indétectables et 43 étaient détectables (moyenne CV= de 4.42 log copies/ml) alors qu'avec la plate-forme GEN, 26 échantillons étaient indétectables et 55 détectables (moyenne CV= 4.08 log copies/ml). Deux échantillons étaient détectés uniquement sur CAP-CTM et 13 uniquement par GEN. Parmi les 57 échantillons avec des CV détectables sur CAP-CTM et/ou GEN, 14 avaient présenté des discordances dont 7 échantillons sous quantifiés par CAP-CTM et 7 autres sous quantifiée par GEN. Les tests de corrélation et de concordance ont montré entre les deux techniques une valeur $r^2 = 0,94$ et un biais = -0.0512.

- **Analyse des discordances**

La comparaison des charges virales entre les différentes plateformes a permis de répertorier 86 discordances et la meilleure concordance était retrouvée entre m2000sp/rt et CTM (3 discordances). EQ et GEN présentait la plus grande valeur de biais avec 20 discordances. Toutes les discordances étaient répertoriées sur 37

échantillons et la plupart de ces discordances impliquées la plateforme EQ qui sous quantifiait 9/20 échantillons CRF02_AG discordants

L'analyse des différences de polymorphisme réalisée sur 20 séquences de CRF02_AG n'a pas montré de différences significatives en dépit de quelques erreurs retrouvées

CHAPITRE 5 :

DISCUSSION

Chapitre 5 : Discussion

Les résultats de ces travaux ont été comparés avec la littérature et ont fait l'objet de publication pour chaque objectif spécifique. Ainsi pour chaque travail nous pouvons retenir :

1. Détermination de la diversité génétique et de la fréquence élevée de doubles infections du VIH-1

Notre étude a montré la présence importante du sous-type C avec différents variants chez les HSHs et confirme les résultats obtenus en 2013 dans le même groupe des HSHs (**Ndiaye et al., 2009**), même si ce sont les CRF02_AG qui sont majoritaires dans la population générale (**Thiam et al., 2013**) et dans le groupe des professionnelles du sexe (**Hamel et al., 2007**). Cela montre la grande diversité génétique avec la circulation des différents variants.

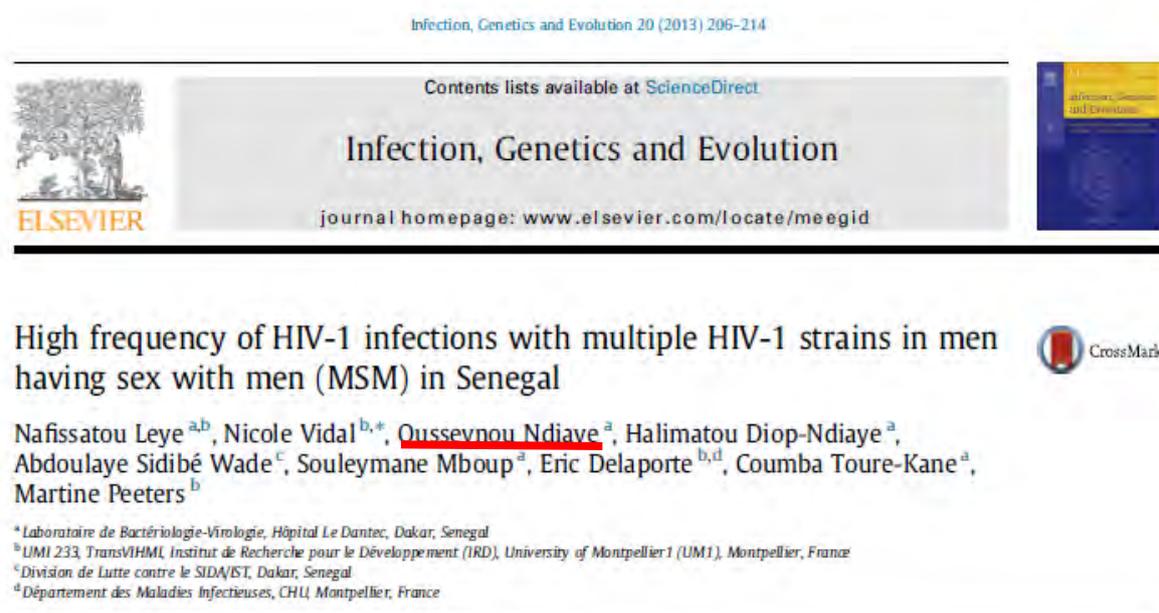
Dans cette étude, nous avons également analysé dans quelle mesure les infections doubles avec différentes variantes du VIH-1 se produisent dans un groupe de population ayant des comportements à risque élevé, avec une forte prévalence du VIH-1 et dans une zone où plusieurs sous-types du VIH-1 et des CRFs co-circuler. Nos données montrent un taux élevé de double infection dans la population HSH du Sénégal. Au moins 11 (15,9%) des 69 patients ont été simultanément infecté par deux sous-types du VIH-1 différents et/ou CRF, et au moins 11 (37,9%) à 14 (48,3%) des 29 patients infectés par le sous-type C dans gag abrité deux variantes différentes sous-type C. Ces données suggèrent qu'au moins 22-25 (de 31,9 à 36,2%) des 69 MSM de cette étude sont infectés par plus d'une souche VIH-1. Ce sont des estimations peuvent être considérées comme faibles, parce que les sondes utilisées dans l'essai MHA ont détectés uniquement 55/69 (79,7%) des infections à VIH-1 en gag, et 60/69 (86,9%) dans VPU. Ces taux de détection sont un peu plus faibles que ceux précédemment rapportés pour le développement de l'essai, à savoir, 88,3% et 93,3% dans gag et vpu, respectivement (**Vidal et al., 2013**).

Ce travail a confirmé une fréquence élevée de doubles infections avec des sous-types/CRFs différents. La différence de prévalences entre la population générale et les MSMs révèle l'importance d'une prévalence élevée et des comportements à

risque dans l'émergence de doubles infections. Et ainsi pouvant entraîner la formation de nouvelles formes recombinantes.

Cela démontre la nécessité d'accroître les efforts pour soutenir les programmes de prévention et de prise en charge ciblant les groupes vulnérables particulièrement celui des HSHs au Sénégal.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases Journal* (cf. article annexe 1).



2. Détermination de la diversité génétique du VHC chez les usagers de drogue

Notre étude a confirmé l'existence des utilisateurs de drogues telles que l'héroïne et la cocaïne au Sénégal (environ 1300 dans la région de Dakar). L'héroïne est le plus fréquemment utilisée des produits opiacés, bien que 27,7% des utilisateurs ont déclaré avoir injecté au moins une fois dans leur vie. L'héroïne est également la drogue injectable la plus utilisée dans les autres pays d'Afrique sub-saharienne (**Reid, 2009**). Nous avons également trouvé un nombre élevé de consommation d'alcool (49% des UD dont 16,3% ont déclaré une consommation quotidienne), qui a commencé avant l'usage d'héroïne.

Ainsi les tests sérologiques ont montré pour le VHB, une prévalence de l'Ag HBs dans l'étude qui est très semblable à la prévalence de l'hépatite B chronique chez la

population sénégalaise. Aucun facteur de risque associé à l'utilisation de drogue ou à des déterminants comportementaux n'a été identifié.

Par contre, La prévalence du VIH trouvée parmi les UD est 7 fois plus élevée que dans la population générale et est fortement liée à la pratique de l'injection (prévalence du VIH de 9,4% en injecteurs) et le sexe (prévalence du VIH de 13% chez les femmes). Les femmes sont également plus exposées au VIH par injection (21,1% contre 7,5% pour les hommes) (**Cleland et al., 2007**).

En ce qui concerne l'hépatite C, le taux constaté chez les usagers de drogue est plus de 17 fois plus élevé que dans le groupe des donneurs de sang (23,3% versus 1,4%) et est fortement liée à la pratique de l'injection. Dans les pays développés, les facteurs de risque associés à l'infection par le VHC sont l'âge, l'injection (**McMahon et al., 2007**) et plus récemment identifié, la consommation de crack et les logements instables (**Jauffret-Roustide et al., 2009; Shannon et al., 2008**). Ces voies de transmission qui sont également des indicateurs de précarité doivent donc être explorées dans le contexte des pays en développement et pourrait expliquer en partie le taux élevé d'infection par le VHC chez les non-injecteurs.

Ces données ont fait l'objet d'une publication dans Journal of the International AIDS Society (cf. article annexe 2).

Leprêtre A et al. *Journal of the International AIDS Society* 2015, **18**:19888
<http://www.jiasociety.org/index.php/jias/article/view/19888> | <http://dx.doi.org/10.7448/IAS.18.1.19888>



Research article

Prevalence and behavioural risks for HIV and HCV infections in a population of drug users of Dakar, Senegal: the ANRS 12243 UDSEN study

Annie Leprêtre^{5,1}, Idrissa Ba², Karine Lacombe^{5,3,4,5}, Maryvonne Maynard⁶, Abdalla Toufik¹, Ousseynou Ndiaye⁶, Coumba Toure Kane⁷, Joël Gozlan^{3,8}, Judicaël Tine⁵, Ibrahim Ndoeye⁶, Gilles Raguin^{9,4} and Pierre-Marie Girard^{3,4,5}

⁵Corresponding authors: Annie Leprêtre, Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée, Université Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, FR-75018 Paris, France. Tel: +33 1 39 59 71 71. Fax: +33 1 39 59 71 71. (anlepretre@gmail.com); Karine Lacombe, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Fbg Saint-Antoine, FR-75012 Paris, France. Tel: +33 1 49283137. Fax: +33 1 49282149. (karine.lacombe@sat.aphp.fr)

Le génotypage a été réalisé par la technique Versant[®] HCV genotype sur les 25 DBS amplifiés et ce sont les génotypes 1a et 1b qui sont majoritairement retrouvés avec 21 (84%) des 25 génotypages réalisés. Des résultats similaires ont été obtenus aux Etats Unis où ceux sont les génotypes 1a et 1b qui étaient prédominants (**Blatt et al., 2000; Dias et al., 2011**) et ce sont les génotypes 1a and 3a qui sont majoritairement représentés en Europe (**Bourliere et al., 2002; van Asten et al., 2004**). Dans les autres pays d'Afrique de l'Ouest, c'est le génotype 2 qui est prédominant particulièrement en Guinée Bissau dans la population générale (**Plamondon et al., 2007**) et au Ghana, c'est le génotype 2 (87%) et le génotype 1 (13%) qui est majoritaire dans le groupe des donneur de sang (**Candotti et al., 2003**). Au Cameroun, ce sont le génotype 1 et 4 qui sont prédominants (**Njouom et al., 2008; Pasquier et al., 2005**) et en Afrique du Nord particulièrement en Egypte c'est le génotype 4 (**Elkady et al., 2009**).

Le génotypage a été également réalisé avec Abbott HCV Genotype II[®] et présente une bonne concordance Versant[®] HCV genotype. Toutefois, Abbott détecte également avec un cas de double infection entre le génotype 1 et 2. Des résultats similaires ont été reportés par Lui CH (**Liu et al., 2015**) Comparant Abbott et LiPA avec un taux de concordance > 99.2% et aussi un patient with un double infection 1a+1b.

Ce travail a également été soumis et accepté dans « Journal of Medical Virology » (cf. article annexe 3).

Usefulness of Dried Blood Spots (DBS) to perform hepatitis C virus genotyping in drug users in Senegal

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<u>Ndiaye, Ousseynou</u> ; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, ; Centre Régional de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida-CHU Fann, Gozlan, Joel; Hôpital St Antoine, Diop-Ndiaye, Halimatou; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Sow-Sall, Amina; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Chapelain, Sophie; Hôpital St Antoine, Leprêtre, Annie; Institut de Médecine et Epidémiologie Appliquées-IMEA, Maynard, Maryvonne; Centre Régional de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida-CHU Fann, Gueye, Malle; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, LO, Gora; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Thiam, Moussa; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Ba, Idrissa; Service Psychiatrie-CHU Fann, Lacombe, K; Hôpital St Antoine, Girard, Pierre; Hôpital St Antoine, M'Boup, souleymane; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Kane, Coumba Toure; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec,
Keywords:	HCV, Drug users , DBS, Senegal

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons

3. Evaluation des performances de Nuclisens EasyQ v2.0® (biomerieux) par rapport a la technique de diagnostic amplicor hiv-1 dna test®, v1.5 des laboratoires de roche

Les résultats de notre travail portant sur l'évaluation du NucliSENS ont permis de trouver une sensibilité et une spécificité de 100% pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH aussi bien sur des prélèvements de sang total sur tube EDTA que sur DBS. Ce travail a montré que les techniques ARN pouvaient bien être utilisés dans le cadre du diagnostic néonatal de l'infection à VIH, et en plus le NucliSENS

dédié à la quantification donne aussi une idée sur le niveau de réplication virale. La technique ADN de Amplicor est la référence pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH-1 et sa performance sur DBS et sang total sur tube a été validé au cours de plusieurs études dans des pays Nord et Sud (**Sherman et al., 2005**). En Thaïlande, où le recombinant CFR01_AE est prédominant (**Leelawiwat et al., 2009**), les recherches ont montré que la sensibilité du Amplicor avec les prélèvements de sang total sur tube augmentait de 40% à la naissance à 100% à l'âge de 2 mois, et sa spécificité était de 100% quelque soit l'âge. Des études menées aux Etats Unis ont comparé l'utilisation de l'ADN proviral et de l'ARN pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH. La sensibilité de ces tests variait selon l'âge. Chez les enfants de moins de 3 semaines de vie, des valeurs de sensibilité de 27% pour l'ADN, 64% pour le test quantitatif ARN et 55% pour les tests qualitatifs ont été trouvés. Ces mêmes tests avaient une sensibilité de 96,2% chez les enfants âgés de 4 à 6 semaines et de 100% pour ceux de plus de 7 mois de vie. La spécificité de la PCR ADN pour tous ces groupes d'âge était de 100%, alors que celle des tests quantitatives et qualitatives ARN était de 95,5 et 96,1% (**Cunningham et al., 1999**).

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Clinical Microbiology (cf. article annexe 4).

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2011, p. 2590-2593
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02402-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 7

RNA versus DNA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 versus Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5) for Early Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants in Senegal[▽]

K. Kébé, O. Ndiaye, H. Diop Ndiaye, P. Mbakob Mengue, P. M. M. Guindo, S. Diallo, N. Léye, S. B. Gueye, A. Gaye Diallo, C. Touré Kane,* and S. Mboup

Laboratoire de Bactériologie Virologie, Hôpital Aristide le Dantec, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

Received 26 November 2010/Returned for modification 15 February 2011/Accepted 1 April 2011

The objective of this study was to compare the performance of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 platform (bioMérieux, France) to the Amplicor HIV-1 DNA test v1.5 (Roche Molecular Systems, Switzerland) in detecting HIV-1 infection in infants using venipuncture-derived whole blood in tubes and dried blood spots. A total of 149 dried blood spots and 43 EDTA-anticoagulated peripheral blood samples were collected throughout Dakar and other areas in Senegal from infants and children aged 3 weeks to 24 months who were born to HIV-1-infected mothers. Samples were tested using the NucliSENS and Amplicor technologies. The NucliSENS and Amplicor results were 100% concordant using either EDTA-anticoagulated peripheral blood or dried blood spots. Compared to Amplicor, the sensitivity and specificity of the NucliSENS test were 100%. The NucliSENS EasyQ HIV-1 RNA assay performed as well as the Amplicor HIV-1 DNA test in detecting HIV-1 infection in infants. In addition, this platform can give an indication of the viral load baseline. The NucliSENS EasyQ platform is a good alternative for early infant diagnosis of HIV-1 infection.

4. Comparaison de quatre techniques commerciales de charge virale dans une zone de circulation des sous-types non B

L'analyse de la performance d'Abbott RealTime a permis de retrouver de bonnes valeurs en ce qui concerne la répétabilité, la reproductibilité, l'incertitude, la justesse et la contamination. La vérification de la performance d'Abbott est acceptable comparée à d'autres études (**Scott et al., 2009; Sollis et al., 2014**)

Cette étude a aussi permis de comparer les performances de quatre techniques dans un contexte caractérisé par une grande diversité génétique avec une prédominance du CRF02_AG. La comparaison des techniques de quantification de la CV a montré une forte corrélation et une bonne concordance entre les différentes plateformes. Les meilleures valeurs de corrélation ($r^2 = 0,98$) et de concordance (biais = $-0,00185$ ($-0,0761$ à $0,0726$)) étaient retrouvées entre Abbott et CTM et confirment les résultats décrits dans d'autres études (**Bourlet et al., 2011; Scott et al., 2009**). La Comparaison entre *m2000sp/rt* and EQ montre une bonne corrélation ($r^2 = 0.96$) et une relative bonne concordance (biais = -0.144 (-0.256 à 0.0326)). Toutefois, un nombre relativement élevé de résultats faux positif ($1/73$ sur *m2000sp/rt* et $6/73$ sur EQ) et échantillons sous quantifiés ($5/73$ *m2000sp/rt* et $15/73$ EQ) a été noté entre les deux plateformes. Des résultats similaires ont été retrouvés entre EQ et les autres plateformes avec un nombre élevé de faux négatifs et d'échantillons sous quantifiés par EQ. La plus petite valeur de corrélation a été trouvée entre les plateformes EQ et la trousse GEN ($r^2 = 0,90$ et un biais = -0.130).

Plusieurs autres études reportaient des données similaires d'échantillons sous quantification (**Bourlet et al., 2011**) et de résultats faux négatifs de EQ particulièrement dans les échantillons non-B (**Church et al., 2011**). En effet, quelques travaux reportaient des difficultés de la plateforme EQ pour quantifier les sous types non-B dont le C, A1, AG, G et CRF02_AG (**Hirsch et al., 2008; Korenromp et al., 2009**). Pour le CRF02_AG, notre étude confirme les résultats obtenus dans la littérature portant sur la sous-quantification d'EQ (**Rouet et al., 2010**)

Toutefois, l'analyse des différences de polymorphisme sur le gène *gag* n'a pas montré de différences notables qui pourraient expliquer les échecs ou les succès pour la détection des échantillons par la plateforme EQ. Cela pourrait être du au fait

que la séquence amplifiée (461 pb de *gag p24*) peut ne pas couvrir le site de fixation des amorces et des sondes de EQ.

En résumé, cette étude a trouvé une bonne corrélation entre m2000sp/rt et les autres plateformes et a confirmé que la technique EQ sous quantifie quelques échantillons CRF02_AG, lequel est prédominant au Sénégal et dans les régions Ouest-Africain. Toutefois, des efforts pour améliorés la plateforme EQ pour la quantification des sous type non-B sont nécessaires.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Virological Methods (cf. article annexe 5).



Comparison of four commercial viral load techniques in an area of non-B HIV-1 subtypes circulation



Ousseynou Ndiave^a, Halimatou Diop-Ndiaye^{a,*}, Abdou Salam Ouedraogo^b,
 Fatim Zahra Fall-Malick^a, Amina Sow-Sall^a, Moussa Thiam^a,
 Abou Abadallah Malick Diouara^a, Cheikh Tidiane Ndour^a, Aïssatou Gaye-Diallo^a,
 Souleymane Mboup^a, Coumba Toure-Kane^a, Study Group¹

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale :

Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'Hépatite C (VHC) sont des virus à acide ribonucléique (ARN) qui sont caractérisés par une étape de rétrotranscription du génome en ADN (acide désoxyribonucléique). Cette étape de rétrotranscription est réalisée par une enzyme : la transcriptase inverse qui permet au VIH et au VHC de se répliquer mais cette enzyme ne possède pas de mécanisme de détection des erreurs de transcription. Les erreurs sont donc fréquentes et ainsi, dans un seul organisme infecté il y a déjà plusieurs variants génétiques, représentant ainsi des quasi-espèces virales. Une des caractéristiques majeures des deux virus est donc leur grande variabilité et elle est responsable de la classification des virus en types, groupes, sous-types, sous sous-types et formes recombinantes circulants. Cette grande diversité peut impacter sur le diagnostic, la quantification de la charge virale, la progression de la maladie, la réponse au traitement antirétroviral et le développement de vaccins. La diversité génétique constitue donc un grave problème de santé publique.

Le VIH au Sénégal est une épidémie de type concentré c'est-à-dire faible au niveau de la population générale et élevée dans les groupes vulnérables comme les professionnelles du sexe et les hommes qui ont des rapports sexuels avec les hommes. Cette forte prévalence conjuguée à la diversité génétique et aux comportements à risques peuvent être à l'origine des doubles infections, à l'émergence et la diffusion de nouveaux recombinants. C'est ainsi que nous nous sommes fixés comme objectifs spécifiques de déterminer cette diversité génétique et la fréquence des doubles infections dans le groupe des hommes qui ont des rapports sexuels avec les hommes. Cette étude a porté sur 69 HSHs traités en MHA et par analyse phylogénique sur les gènes *gag* et *vpu* et a montré la présence importante du sous-type C avec différents variants chez les HSHs et confirme les résultats obtenus en 2013 dans le même groupe des HSHs (**Ndiaye et al., 2013**). De plus, ce travail a confirmé une fréquence élevée de doubles infections avec des sous-types/CRFs différents, mais aussi avec un même sous-type. Cette forte fréquence des doubles infections peuvent être à l'origine de l'apparition de nouvelles formes recombinantes entraînant ainsi une diversité génétique plus importantes.

Nous nous sommes également fixés comme objectif spécifique de décrire la diversité génétique du VHC au Sénégal. Une première étude menée sur le groupe des usagers de drogue avait montré une prévalence plus élevée du VHC (23,3%) devant le VHB (7,9%) et le VIH (5,2%) et ces résultats ont été publiés dans JIAS (**Lepretre et al., 2015**). C'est dans ce contexte que nous avons entrepris une étude sur la diversité une étude pilote, une première du genre au Sénégal particulièrement dans le groupe des usagers de drogue avec le papier buvard comme support de prélèvement. Cette étude a montré la prédominance du génotype 1 dans le groupe des usagers de drogue même si c'est le génotype 2 qui est prédominant dans la population générale en Afrique de l'ouest. Le traitement de référence étant un traitement génotype dépendant, les génotypes 1 et 4 sont moins sensibles et nécessitent un temps d'exposition plus longue. Mais récemment, avec l'autorisation des premières générations de TARV comme les anti-protéases (bocéprévir et telaprévir) et les anti-polymérase (sofosbuvir), les nouveaux traitements associent maintenant les ARV et/ou l'interféron pégylés entre 24 à 48 semaines (**Pawlotsky, 2014**). Cette étude a aussi montré qu'après une optimisation de l'utilisation DBS, ils peuvent être une bonne alternative pour les prélèvements de sang sur tube pour génotypage et la charge virale du VHC. Ce travail a également été soumis dans « Journal of Medical Virology »

La surveillance de cette grande diversité génétique et l'évaluation des tests biologiques sont donc nécessaires pour assurer un suivi optimal des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et/ou VHC. Le diagnostic est essentiellement basé sur des tests sérologiques mais pour les enfants nés de mères séropositives, c'est le diagnostic moléculaire qui est effectué du fait de la persistance des anticorps maternels. L'importance de débiter le TARV à un stade précoce de la vie de l'enfant infecté est aujourd'hui bien documentée. Il est donc crucial de disposer d'outils de diagnostic adéquats. C'est dans ce sens que nous avons décidé d'évaluer les performances de la plateforme NucliSENS qui est une technique automatisée permettant de détecter l'ARN du virus par rapport à la technique de référence Amplicor. La technique de référence Amplicor basée sur une détection de l'ADN proviral comporte plusieurs étapes manuelles, c'est une PCR classique avec des étapes post-PCR et dure environ 6 heures. Les plateformes automatisées basées sur la détection de l'ARN viral sont maintenant disponibles, ces plateformes sont simples et le résultat de l'analyse peut être obtenu en un temps très court et sans étape post

amplification. Le NucliSENS a une sensibilité de 100% et une spécificité de 100% par rapport à Amplicor. Sa valeur prédictive positive est de 100% et sa valeur prédictive négative est de 100%. Il représente donc un outil alternatif pour le diagnostic de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois de vie permettant ainsi de pouvoir initier le traitement ARV le plus précocement possible en cas de résultats de PCR positif. L'OMS recommande pour la confirmation de la première PCR d'utiliser un test de quantification de la charge virale qui permettra à la fois de confirmer la PCR1 mais aussi d'avoir une valeur de charge virale à l'initiation du traitement. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Clinical Microbiology*

L'évaluation de l'efficacité du traitement antirétroviral se faisant avec la quantification de la charge virale plasmatique, l'utilisation de la charge virale est devenue donc une recommandation forte de l'OMS pour le suivi des patients sous ARV depuis 2013. Il devient donc urgent pour les programmes nationaux de disposer de techniques de quantification fiable et à moindre coût pour un suivi optimal. Diverses techniques de quantification de la charge virale plasmatiques sont maintenant disponibles et sont basées sur des principes différents. C'est pour cette raison que nous nous sommes fixé comme objectif de comparer quatre techniques commerciales de quantification de la charge virale dans une zone de circulation des sous-types non B. Nos travaux nous ont permis de trouver une forte corrélation et une bonne concordance entre les différentes techniques de charge virale et confirme que la technique EQ sous quantifie quelques échantillons CRF02_AG, lequel est prédominant au Sénégal et dans les régions Ouest-Africain. Toutefois, des efforts pour améliorer la plateforme EQ pour la quantification des sous type non-B sont nécessaires. Cette étude a été publiée dans *Journal of Virological Methods*.

Toutefois le choix d'une plateforme de charge virale ne dépend pas uniquement des spécifications techniques et de la comparaison des performances mais aussi d'autres paramètres tels que la disponibilité des réactifs, un bon service après vente, le coût d'acquisition des appareils, du nombre de tests par jour, du coût des tests, des infrastructures, des ressources humaines nécessaires et la capacité à utiliser les DBS et la prévalence du VIH-2.

PERSPECTIVES

RECOMMENDATIONS

Les perspectives et recommandations :

Nos travaux de thèse nous ont permis de dégager les perspectives suivantes:

Pour le VIH :

- ✓ Evaluation des doubles infections VIH-1 dans les autres groupes clés tels que PS et UDs
- ✓ Etude de cohorte sur les MSMs, PS et les UDs doubles infectés pour vérifier l'émergence de nouvelles formes recombinantes

Pour le VHC :

- ✓ Documenter la prévalence et la diversité génétique du VHC dans la PG et les autres groupes clés tels que les MSMs, les PS et les UDs (un nombre d'échantillon plus important).
- ✓ Evaluer les techniques de diagnostic, de charge virale et de génotypage pour le VHC

Les résultats de nos travaux nous ont permis également de formuler quelques recommandations :

Pour le programme national de lutte contre le SIDA

- ✓ Observatoire pour contrôler l'évolution de la diversité génétique
- ✓ Accentuer les efforts pour soutenir les programmes de prévention et de prise en charge ciblant les populations clés en vue de réduire les comportements à risques au Sénégal.
- ✓ Renforcer la décentralisation des plateformes moléculaires de diagnostic et de CV en mettant l'accent sur un bon système de contrôle de qualité.

Pour le programme national de lutte contre les hépatites virales :

- ✓ Mettre à la disposition des PVVHC les Antiviraux
- ✓ Soutenir les stratégies de réduction des risques pour les Uds
- ✓ Aller vers une intégration des programmes pour la réalisation des tests de diagnostic, de charge virale et de génotypage pour le VHC
- ✓ Mettre en place un système de contrôles de qualités des tests

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Adamson C.S.**, 2012. Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. **Molecular biology international** 2012, 604261
2. **Adje C., Cheingsong R., Roels T.H., Maurice C., Djomand G., Verbiest W., Hertogs K., Larder B., Monga B., Peeters M., Eholie S., Bissagene E., Coulibaly M., Respass R., Wiktor S.Z., Chorba T., Nkengasong J.N.**, 2001. High prevalence of genotypic and phenotypic HIV-1 drug-resistant strains among patients receiving antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 26, 501-506.
3. **Alfaleh F.Z., Hadad Q., Khuroo M.S., Aljumah A., Algamedi A., Alashgar H., Al-Ahdal M.N., Mayet I., Khan M.Q., Kessie G.**, 2004. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C in Saudi patients commonly infected with genotype 4. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver** 24, 568-574.
4. **Alter H.J., Purcell R.H., Holland P.V., Popper H.**, 1978. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. **Lancet** 1, 459-463.
5. **Anderson J.P., Rodrigo A.G., Learn G.H., Madan A., Delahunty C., Coon M., Girard M., Osmanov S., Hood L., Mullins J.I.**, 2000. Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E. **Journal of virology** 74, 10752-10765.
6. **Andre P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Brechot C., Paranhos-Baccala G., Lotteau V.**, 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. **Journal of virology** 76, 6919-6928.
7. **Angelico M., Renganathan E., Gandin C., Fathy M., Profili M.C., Refai W., De Santis A., Nagi A., Amin G., Capocaccia L., Callea F., Rapicetta M., Badr G., Rocchi G.**, 1997. Chronic liver disease in the Alexandria governorate, Egypt: contribution of schistosomiasis and hepatitis virus infections. **Journal of hepatology** 26, 236-243.
8. **Ansaldi F., Bruzzone B., Salmaso S., Rota M.C., Durando P., Gasparini R., Icardi G.**, 2005. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. **Journal of medical virology** 76, 327-332.

9. **Apetrei C., Descamps D., Collin G., LouSSERT-Ajaka I., Damond F., Duca M., Simon F., Brun-Vezinet F.**, 1998. Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility. **Journal of virology** 72, 3534-3538.
10. **Appel N., Bartenschlager R.**, 2006. A novel function for a micro RNA: negative regulators can do positive for the hepatitis C virus. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 43, 612-615.
11. **Appel N., Pietschmann T., Bartenschlager R.**, 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. **Journal of virology** 79, 3187-3194.
12. **Argentini C., Dettori S., Villano U., Guadagnino V., Infantolino D., Dentico P., Coppola R.C., Rapicetta M.**, 2000. Molecular characterisation of HCV genotype 4 isolates circulating in Italy. **Journal of medical virology** 62, 84-90.
13. **Arrildt K.T., Joseph S.B., Swanstrom R.**, 2012. The HIV-1 env protein: a coat of many colors. **Current HIV/AIDS reports** 9, 52-63.
14. **Arthur L.O., Bess J.W., Jr., Sowder R.C., 2nd, Benveniste R.E., Mann D.L., Chermann J.C., Henderson L.E.**, 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. **Science (New York, N.Y.)** 258, 1935-1938.
15. **Astier-Gin T., Bellecave P., Litvak S., Ventura M.**, 2005. Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA. **The FEBS journal** 272, 3872-3886.
16. **Auewarakul P., Wacharapornin P., Srichatrapimuk S., Chutipongtanate S., Puthavathana P.**, 2005. Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. **Virology** 337, 93-101.
17. **Ayouba A., Mauciere P., Martin P.M., Cunin P., Mfoupouendoun J., Njinku B., Souquieres S., Simon F.**, 2001. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. **Emerging infectious diseases** 7, 466-467.
18. **Ayouba A., Souquieres S., Njinku B., Martin P.M., Muller-Trutwin M.C., Roques P., Barre-Sinoussi F., Mauciere P., Simon F., Nerrienet E.**, 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. **AIDS (London, England)** 14, 2623-2625.

19. **Bachu M., Mukthey A.B., Murali R.V., Cheedarla N., Mahadevan A., Shankar S.K., Satish K.S., Kundu T.K., Ranga U., 2012.** Sequence insertions in the HIV type 1 subtype C viral promoter predominantly generate an additional NF-kappaB binding site. **AIDS research and human retroviruses** 28, 1362-1368.
20. **Bailes E., Gao F., Bibollet-Ruche F., Courgnaud V., Peeters M., Marx P.A., Hahn B.H., Sharp P.M., 2003.** Hybrid origin of SIV in chimpanzees. **Science (New York, N.Y.)** 300, 1713.
21. **Bain C., Parroche P., Lavergne J.P., Duverger B., Vieux C., Dubois V., Komurian-Pradel F., Treppe C., Gebuhrer L., Paranhos-Baccala G., Penin F., Inchauspe G., 2004.** Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. **Journal of virology** 78, 10460-10469.
22. **Bakhanashvili M., Novitsky E., Levy I., Rahav G., 2005.** The fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increases in the presence of polyamines. **FEBS letters** 579, 1435-1440.
23. **Barin F., M'Boup S., Denis F., Kanki P., Allan J.S., Lee T.H., Essex M., 1985.** Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. **Lancet** 2, 1387-1389.
24. **Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., 1983.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science (New York, N.Y.)** 220, 868-871.
25. **Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., 2004.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion** 56, 126-129.
26. **Bartenschlager R., Frese M., Pietschmann T., 2004.** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Advances in virus research** 63, 71-180.
27. **Basu V.P., Song M., Gao L., Rigby S.T., Hanson M.N., Bambara R.A., 2008.** Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. **Virus research** 134, 19-38.

28. **Benedicto I., Molina-Jimenez F., Barreiro O., Maldonado-Rodriguez A., Prieto J., Moreno-Otero R., Aldabe R., Lopez-Cabrera M., Majano P.L., 2008.** Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 48, 1044-1053.
29. **Berger A., Scherzed L., Sturmer M., Preiser W., Doerr H.W., Rabenau H.F., 2005.** Comparative evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology** 33, 43-51.
30. **Blatt L.M., Mutchnick M.G., Tong M.J., Klion F.M., Lebovics E., Freilich B., Bach N., Smith C., Herrera J., Tobias H., Conrad A., Schmid P., McHutchison J.G., 2000.** Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. **Journal of viral hepatitis** 7, 196-202.
31. **Blight K.J., Kolykhalov A.A., Rice C.M., 2000.** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science (New York, N.Y.)** 290, 1972-1974.
32. **Blish C.A., Dogan O.C., Derby N.R., Nguyen M.A., Chohan B., Richardson B.A., Overbaugh J., 2008.** Human immunodeficiency virus type 1 superinfection occurs despite relatively robust neutralizing antibody responses. **Journal of virology** 82, 12094-12103.
33. **Bodelle P., Vallari A., Coffey R., McArthur C.P., Beyeme M., Devare S.G., Schochetman G., Brennan C.A., 2004.** Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. **AIDS research and human retroviruses** 20, 902-908.
34. **Bonny C., Fontaine H., Poynard T., Hezode C., Larrey D., Marcellin P., Bourliere M., Bronowicki J.P., Merle P., Zarski J.P., Sapey T., Guillemard C., Ughetto S., Henquell C., Nicolas C., Roche C., Randl K., Bommelaer G., Abergel A., 2006.** Effectiveness of interferon plus ribavirin combination in the treatment of naive patients with hepatitis C virus type 5. A French multicentre retrospective study. **Alimentary pharmacology & therapeutics** 24, 593-600.
35. **Boulant S., Montserret R., Hope R.G., Ratinier M., Targett-Adams P., Lavergne J.P., Penin F., McLauchlan J., 2006.** Structural determinants that target the

- hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **The Journal of biological chemistry** 281, 22236-22247.
36. **Boulant S., Targett-Adams P., McLauchlan J.**, 2007. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. **The Journal of general virology** 88, 2204-2213.
37. **Bourlet T., Signori-Schmuck A., Roche L., Icard V., Saoudin H., Trabaud M.A., Tardy J.C., Morand P., Pozzetto B., Ecochard R., Andre P.**, 2011. HIV-1 load comparison using four commercial real-time assays. **Journal of clinical microbiology** 49, 292-297.
38. **Bourliere M., Barberin J.M., Rotily M., Guagliardo V., Portal I., Lecomte L., Benali S., Boustiere C., Perrier H., Jullien M., Lambot G., Loyer R., LeBars O., Daniel R., Khiri H., Halfon P.**, 2002. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France: evidence in intravenous drug users. **Journal of viral hepatitis** 9, 62-70.
39. **Brady J., Kashanchi F.**, 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. **Retrovirology** 2, 69.
40. **Brass V., Bieck E., Montserret R., Wolk B., Hellings J.A., Blum H.E., Penin F., Moradpour D.**, 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **The Journal of biological chemistry** 277, 8130-8139.
41. **Braun P., Ehret R., Wiesmann F., Zabbai F., Knickmann M., Kuhn R., Thamm S., Warnat G., Knechten H.**, 2007. Comparison of four commercial quantitative HIV-1 assays for viral load monitoring in clinical daily routine. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC** 45, 93-99.
42. **Brazzoli M., Bianchi A., Filippini S., Weiner A., Zhu Q., Pizza M., Crotta S.**, 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. **Journal of virology** 82, 8316-8329.
43. **Brennan C.A., Bodelle P., Coffey R., Devare S.G., Golden A., Hackett J., Jr., Harris B., Holzmayer V., Luk K.C., Schochetman G., Swanson P., Yamaguchi J., Vallari A., Ndembi N., Ngansop C., Makamche F., Mbanya D., Gurtler L.G., Zekeng L., Kaptue L.**, 2008. The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 49, 432-439.

44. **Bressanelli S., Tomei L., Rey F.A., De Francesco R.**, 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. **Journal of virology** 76, 3482-3492.
45. **Bressanelli S., Tomei L., Rousset A., Incitti I., Vitale R.L., Mathieu M., De Francesco R., Rey F.A.**, 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96, 13034-13039.
46. **Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H.**, 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 89, 4942-4946.
47. **Bunnik E.M., Swenson L.C., Edo-Matas D., Huang W., Dong W., Frantzell A., Petropoulos C.J., Coakley E., Schuitemaker H., Harrigan P.R., van 't Wout A.B.**, 2011. Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. **PLoS pathogens** 7, e1002106.
48. **Burlone M.E., Budkowska A.**, 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **The Journal of general virology** 90, 1055-1070.
49. **Burt RD, Thiede H.** 2014. Assessing differences in groups 251 randomized by recruitment chain in a respondent-driven sample of Seattle-area injection drug users. **Ann Epidemiol** 24:861-867.
50. **Butler I.F., Pandrea I., Marx P.A., Apetrei C.**, 2007. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. **Current HIV research** 5, 23-45.
51. **Callens N., Ciczora Y., Bartosch B., Vu-Dac N., Cosset F.L., Pawlotsky J.M., Penin F., Dubuisson J.**, 2005. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. **Journal of virology** 79, 15331-15341.
52. **Candotti D., Temple J., Sarkodie F., Allain J.P.**, 2003. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa. **Journal of virology** 77, 7914-7923.
53. **Carr J.K., Salminen M.O., Albert J., Sanders-Buell E., Gotte D., Birx D.L., McCutchan F.E.**, 1998. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. **Virology** 247, 22-31.

54. **Carrere-Kremer S., Montpellier-Pala C., Cocquerel L., Wychowski C., Penin F., Dubuisson J.**, 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. **Journal of virology** 76, 3720-3730.
55. **Ceballos A., Remes Lenicov F., Sabatte J., Rodriguez Rodrigues C., Cabrini M., Jancic C., Raiden S., Donaldson M., Agustin Pasqualini R., Jr., Marin-Briggiler C., Vazquez-Levin M., Capani F., Amigorena S., Geffner J.**, 2009. Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. **The Journal of experimental medicine** 206, 2717-2733.
56. **Center R.J., Leapman R.D., Lebowitz J., Arthur L.O., Earl P.L., Moss B.**, 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. **Journal of virology** 76, 7863-7867.
57. **Chambers T.J., Fan X., Droll D.A., Hembrador E., Slater T., Nickells M.W., Dustin L.B., Dibisceglie A.M.**, 2005. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. **Journal of virology** 79, 3071-3083.
58. **Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S.**, 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell** 89, 263-273.
59. **Chen J.C., Krucinski J., Miercke L.J., Finer-Moore J.S., Tang A.H., Leavitt A.D., Stroud R.M.**, 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97, 8233-8238.
60. **Chen R., Le Rouzic E., Kearney J.A., Mansky L.M., Benichou S.**, 2004. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. **The Journal of biological chemistry** 279, 28419-28425.
61. **Chevaliez S., Pawlotsky J.M.**, 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World journal of gastroenterology : WJG** 13, 2461-2466.
62. **Chew C.B., Herring B.L., Zheng F., Browne C., Saksena N.K., Cunningham A.L., Dwyer D.E.**, 1999. Comparison of three commercial assays for the quantification of HIV-1 RNA in plasma from individuals infected with different HIV-1 subtypes. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology** 14, 87-94.

63. **Choi J.Y., Kim E.J., Rho H.J., Kim J.Y., Kwon O.K., Lee J.H., Koo M.J., Kim S.S.,** 2009. Evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 and RealTime HIV-1 kits for quantitation of HIV-1 RNA in plasma. **Journal of virological methods** 161, 7-11.
64. **Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.,** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science (New York, N.Y.)** 244, 359-362.
65. **Church D., Gregson D., Lloyd T., Klein M., Beckthold B., Laupland K., Gill M.J.,** 2011. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. **Journal of clinical microbiology** 49, 118-124.
66. **Church J.D., Huang W., Mwatha A., Musoke P., Jackson J.B., Bagenda D., Omer S.B., Donnell D., Nakabiito C., Eure C., Guay L.A., Taylor A., Bakaki P.M., Matovu F., McConnell M., Fowler M.G., Eshleman S.H.,** 2010. Analysis of HIV tropism in Ugandan infants. **Current HIV research** 8, 498-503.
67. **Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., et al.,** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science (New York, N.Y.)** 233, 343-346.
68. **Cleland C.M., Des Jarlais D.C., Perlis T.E., Stimson G., Poznyak V.,** 2007. HIV risk behaviors among female IDUs in developing and transitional countries. **BMC public health** 7, 271.
69. **Colina R., Casane D., Vasquez S., Garcia-Aguirre L., Chunga A., Romero H., Khan B., Cristina J.,** 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. **The Journal of general virology** 85, 31-37.
70. **Combet C., Garnier N., Charavay C., Grando D., Crisan D., Lopez J., Dehne-Garcia A., Geourjon C., Bettler E., Hulo C., Le Mercier P., Bartenschlager R., Diepolder H., Moradpour D., Pawlotsky J.M., Rice C.M., Trepo C., Penin F., Deleage G.,** 2007. euHCVdb: the European hepatitis C virus database. **Nucleic acids research** 35, D363-366.
71. **Cristina J., Colina R.,** 2006. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. **Virology journal** 3, 53.
72. **Crublet E., Andrieu J.P., Vives R.R., Lortat-Jacob H.,** 2008. The HIV-1 envelope glycoprotein gp120 features four heparan sulfate binding domains, including the

- co-receptor binding site. **The Journal of biological chemistry** 283, 15193-15200.
73. **Cullen B.R.**, 1990. The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? **Cell** 63, 655-657.
74. **Cunningham C.K., Charbonneau T.T., Song K., Patterson D., Sullivan T., Cummins T., Poiesz B.**, 1999. Comparison of human immunodeficiency virus 1 DNA polymerase chain reaction and qualitative and quantitative RNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus 1-exposed infants. **The Pediatric infectious disease journal** 18, 30-35.
75. **D'Souza V., Summers M.F.**, 2005. How retroviruses select their genomes. **Nature reviews. Microbiology** 3, 643-655.
76. **Dandekar D.H., Ganesh K.N., Mitra D.**, 2004. HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. **Nucleic acids research** 32, 1270-1278.
77. **Davis M.R., Jiang J., Zhou J., Freed E.O., Aiken C.**, 2006. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein destabilizes the interaction of the envelope protein subunits gp120 and gp41. **Journal of virology** 80, 2405-2417.
78. **de Baar M.P., van Dooren M.W., de Rooij E., Bakker M., van Gemen B., Goudsmit J., de Ronde A.**, 2001. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. **Journal of clinical microbiology** 39, 1378-1384.
79. **De Francesco R., Migliaccio G.**, 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. **Nature** 436, 953-960.
80. **de Oliveira T., Engelbrecht S., Janse van Rensburg E., Gordon M., Bishop K., zur Megede J., Barnett S.W., Cassol S.**, 2003. Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness? **Journal of virology** 77, 9422-9430.
81. **Debyser Z., Van Wijngaerden E., Van Laethem K., Beuselinck K., Reynders M., De Clercq E., Desmyter J., Vandamme A.M.**, 1998. Failure to quantify viral load with two of the three commercial methods in a pregnant woman harboring an HIV type 1 subtype G strain. **AIDS research and human retroviruses** 14, 453-459.
82. **Delatorre E.O., Bello G.**, 2012. Phylodynamics of HIV-1 subtype C epidemic in east Africa. **PloS one** 7, e41904.

83. **Delelis O., Carayon K., Guiot E., Leh H., Tauc P., Brochon J.C., Mouscadet J.F., Deprez E., 2008.** Insight into the integrase-DNA recognition mechanism. A specific DNA-binding mode revealed by an enzymatically labeled integrase. **The Journal of biological chemistry** 283, 27838-27849.
84. **Delwaide J., Gerard C., Reenaers C., Vaira D., Bastens B., Bataille C., Servais B., Maes B., Belaiche J., Hepatotropes G.L., 2005.** Hepatitis C virus genotype 5 in southern belgium: epidemiological characteristics and response to therapy. **Digestive diseases and sciences** 50, 2348-2351.
85. **Dentzer T.G., Lorenz I.C., Evans M.J., Rice C.M., 2009.** Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. **Journal of virology** 83, 12702-12713.
86. **di Marzo Veronese F., Copeland T.D., DeVico A.L., Rahman R., Oroszlan S., Gallo R.C., Sarngadharan M.G., 1986.** Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. **Science (New York, N.Y.)** 231, 1289-1291.
87. **Diago M., Hassanein T., Rodes J., Ackrill A.M., Sedarati F., 2004.** Optimized virologic response in hepatitis C virus genotype 4 with peginterferon-alpha2a and ribavirin. **Annals of internal medicine** 140, 72-73.
88. **Dias P.T., Hahn J.A., Delwart E., Edlin B., Martin J., Lum P., Evans J., Kral A., Deeks S., Busch M.P., Page K., 2011.** Temporal changes in HCV genotype distribution in three different high risk populations in San Francisco, California. **BMC infectious diseases** 11, 208.
89. **Domingo E., Gomez J., 2007.** Quasispecies and its impact on viral hepatitis. **Virus research** 127, 131-150.
90. **Donaghy H., Wilkinson J., Cunningham A.L., 2006.** HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? **Journal of leukocyte biology** 80, 1001-1012.
91. **Dreux M., Pietschmann T., Granier C., Voisset C., Ricard-Blum S., Mangeot P.E., Keck Z., Fong S., Vu-Dac N., Dubuisson J., Bartenschlager R., Lavillette D., Cosset F.L., 2006.** High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. **The Journal of biological chemistry** 281, 18285-18295.

92. **Dubuisson J., Penin F., Moradpour D.**, 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends in cell biology** 12, 517-523.
93. **Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K.**, 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **Journal of virology** 76, 5974-5984.
94. **Elkady A., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Sugiyama M., Khan A., Sayed D., Moustafa G., Abdel-Hameed A.R., Mizokami M.**, 2009. Genetic variability of hepatitis C virus in South Egypt and its possible clinical implication. **Journal of medical virology** 81, 1015-1023.
95. **Este J.A., Telenti A.**, 2007. HIV entry inhibitors. **Lancet** 370, 81-88.
96. **Evans M.J., Rice C.M., Goff S.P.**, 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 101, 13038-13043.
97. **Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M., Syder A.J., Panis M., Wolk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D., Rice C.M.**, 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature** 446, 801-805.
98. **Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H., Alter H.J., Holland P.V.**, 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **The New England journal of medicine** 292, 767-770.
99. **Felsenstein J.**, 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution** 17, 368-376.
100. **Feng Y.X., Campbell S., Harvin D., Ehresmann B., Ehresmann C., Rein A.**, 1999. The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. **Journal of virology** 73, 4251-4256.
101. **Fernandez-Arcas N., Lopez-Siles J., Trapero S., Ferraro A., Ibanez A., Orihuela F., Maldonado J., Alonso A.**, 2006. High prevalence of hepatitis C virus subtypes 4c and 4d in Malaga (Spain): phylogenetic and epidemiological analyses. **Journal of medical virology** 78, 1429-1435.

102. **Figlerowicz M., Alejska M., Kurzynska-Kokorniak A., Figlerowicz M., 2003.** Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. **Medicinal research reviews** 23, 488-518.
103. **Fiorucci M., Boulant S., Fournillier A., Abraham J.D., Lavergne J.P., Paranhos-Baccala G., Inchauspe G., Bain C., 2007.** Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. **The Journal of general virology** 88, 1149-1162.
104. **Flint M., von Hahn T., Zhang J., Farquhar M., Jones C.T., Balfe P., Rice C.M., McKeating J.A., 2006.** Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. **Journal of virology** 80, 11331-11342.
105. **Frank C., Mohamed M.K., Strickland G.T., Lavanchy D., Arthur R.R., Magder L.S., El Khoby T., Abdel-Wahab Y., Aly Ohn E.S., Anwar W., Sallam I., 2000.** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet** 355, 887-891.
106. **Freed E.O., 1998.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology** 251, 1-15.
107. **Friebe P., Boudet J., Simorre J.P., Bartenschlager R., 2005.** Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. **Journal of virology** 79, 380-392.
108. **Friebe P., Lohmann V., Krieger N., Bartenschlager R., 2001.** Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. **Journal of virology** 75, 12047-12057.
109. **Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Goncales F.L., Jr., Haussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J., 2002.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine** 347, 975-982.
110. **Fung J., Lai C.L., Hung I., Young J., Cheng C., Wong D., Yuen M.F., 2008.** Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. **The Journal of infectious diseases** 198, 808-812.
111. **Gale M., Jr., Foy E.M., 2005.** Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature** 436, 939-945.
112. **Gale M.J., Jr., Korth M.J., Katze M.G., 1998.** Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. **Clinical and diagnostic virology** 10, 157-162.

113. Gallo S.A., Finnegan C.M., Viard M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat S.S., Puri A., Durell S., Blumenthal R., 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochimica et biophysica acta* 1614, 36-50.
114. Gamble T.R., Yoo S., Vajdos F.F., von Schwedler U.K., Worthylake D.K., Wang H., McCutcheon J.P., Sundquist W.I., Hill C.P., 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science (New York, N.Y.)* 278, 849-853.
115. Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.H., 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
116. Gao F., Nainan O.V., Khudyakov Y., Li J., Hong Y., Gonzales A.C., Spelbring J., Margolis H.S., 2007. Recombinant hepatitis C virus in experimentally infected chimpanzees. *The Journal of general virology* 88, 143-147.
117. Gao F., Yue L., White A.T., Pappas P.G., Barchue J., Hanson A.P., Greene B.M., Sharp P.M., Shaw G.M., Hahn B.H., 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495-499.
118. Garrido C., Zahonero N., Corral A., Arredondo M., Soriano V., de Mendoza C., 2009. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. *Journal of clinical microbiology* 47, 1031-1036.
119. Gaschen B., Taylor J., Yusim K., Foley B., Gao F., Lang D., Novitsky V., Haynes B., Hahn B.H., Bhattacharya T., Korber B., 2002. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science (New York, N.Y.)* 296, 2354-2360.
120. Gastaminza P., Cheng G., Wieland S., Zhong J., Liao W., Chisari F.V., 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of virology* 82, 2120-2129.
121. Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399-401.
122. Geijtenbeek T.B., Krooshoop D.J., Bleijs D.A., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C., Grabovsky V., Alon R., Figdor C.G., van Kooyk Y., 2000a. DC-SIGN-

- ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. **Nature immunology** 1, 353-357.
123. **Geijtenbeek T.B., Kwon D.S., Torensma R., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C., Middel J., Cornelissen I.L., Nottet H.S., KewalRamani V.N., Littman D.R., Figdor C.G., van Kooyk Y.**, 2000b. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell** 100, 587-597.
124. **Goila-Gaur R., Strebel K.**, 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. **Retrovirology** 5, 51.
125. **Goodenow M.M., Collman R.G.**, 2006. HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. **Journal of leukocyte biology** 80, 965-972.
126. **Gottlinger H.G.**, 2001. The HIV-1 assembly machine. **AIDS (London, England)** 15 Suppl 5, S13-20.
127. **Gouttenoire J., Castet V., Montserret R., Arora N., Raussens V., Ruyschaert J.M., Diesis E., Blum H.E., Penin F., Moradpour D.**, 2009a. Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. **Journal of virology** 83, 6257-6268.
128. **Gouttenoire J., Montserret R., Kennel A., Penin F., Moradpour D.**, 2009b. An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. **Journal of virology** 83, 11378-11384.
129. **Graham W.D., Barley-Maloney L., Stark C.J., Kaur A., Stolarchuk C., Sproat B., Leszczynska G., Malkiewicz A., Safwat N., Mucha P., Guenther R., Agris P.F.**, 2011. Functional recognition of the modified human tRNA^{Lys3}(UUU) anticodon domain by HIV's nucleocapsid protein and a peptide mimic. **Journal of molecular biology** 410, 698-715.
130. **Gunthard H.F., Wong J.K., Ignacio C.C., Havlir D.V., Richman D.D.**, 1998. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. **AIDS research and human retroviruses** 14, 869-876.
131. **Guo X., Roldan A., Hu J., Wainberg M.A., Liang C.**, 2005. Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag. **Journal of virology** 79, 1803-1812.

132. **Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L., Alizon M.**, 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. **Nature** 326, 662-669.
133. **Hadziyannis S.J., Sette H., Jr., Morgan T.R., Balan V., Diago M., Marcellin P., Ramadori G., Bodenheimer H., Jr., Bernstein D., Rizzetto M., Zeuzem S., Pockros P.J., Lin A., Ackrill A.M.**, 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Annals of internal medicine** 140, 346-355.
134. **Halfon P., Trimoulet P., Bourliere M., Khiri H., de Ledinghen V., Couzigou P., Feryn J.M., Alcaraz P., Renou C., Fleury H.J., Ouzan D.**, 2001. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). **Journal of clinical microbiology** 39, 1771-1773.
135. **Hamel D.J., Sankale J.L., Eisen G., Meloni S.T., Mullins C., Gueye-Ndiaye A., Mboup S., Kanki P.J.**, 2007. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity. **AIDS research and human retroviruses** 23, 1189-1196.
136. **Hare S., Di Nunzio F., Labeja A., Wang J., Engelman A., Cherepanov P.**, 2009. Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. **PLoS pathogens** 5, e1000515.
137. **Hargittai M.R., Mangla A.T., Gorelick R.J., Musier-Forsyth K.**, 2001. HIV-1 nucleocapsid protein zinc finger structures induce tRNA(Lys,3) structural changes but are not critical for primer/template annealing. **Journal of molecular biology** 312, 985-997.
138. **Hauser H., Lopez L.A., Yang S.J., Oldenburg J.E., Exline C.M., Guatelli J.C., Cannon P.M.**, 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. **Retrovirology** 7, 51.
139. **Hemelaar J.**, 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends in molecular medicine** 18, 182-192.
140. **Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D., Osmanov S.**, 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS (London, England)** 20, W13-23.
141. **Hirsch M.S., Gunthard H.F., Schapiro J.M., Brun-Vezinet F., Clotet B., Hammer S.M., Johnson V.A., Kuritzkes D.R., Mellors J.W., Pillay D., Yeni P.G., Jacobsen D.M., Richman D.D.**, 2008. Antiretroviral drug resistance testing in

- adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. **Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA** 16, 266-285.
142. **Hoelscher M., Dowling W.E., Sanders-Buell E., Carr J.K., Harris M.E., Thomschke A., Robb M.L., Birx D.L., McCutchan F.E.**, 2002. Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. **AIDS (London, England)** 16, 2055-2064.
143. **Hoffmann D., Schwarck D., Banning C., Brenner M., Mariyanna L., Krepstakies M., Schindler M., Millar D.P., Hauber J.**, 2012. Formation of trans-activation competent HIV-1 Rev:RRE complexes requires the recruitment of multiple protein activation domains. **PloS one** 7, e38305.
144. **Holguin A.**, 2004. Evaluation of three rapid tests for detection of antibodies to HIV-1 non-B subtypes. **Journal of virological methods** 115, 105-107.
145. **Hong Z., Cameron C.E., Walker M.P., Castro C., Yao N., Lau J.Y., Zhong W.**, 2001. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. **Virology** 285, 6-11.
146. **Hraber P.T., Fischer W., Bruno W.J., Leitner T., Kuiken C.**, 2006. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. **Virology journal** 3, 103.
147. **Huang H., Sun F., Owen D.M., Li W., Chen Y., Gale M., Jr., Ye J.**, 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104, 5848-5853.
148. **Huang L., Hwang J., Sharma S.D., Hargittai M.R., Chen Y., Arnold J.J., Raney K.D., Cameron C.E.**, 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. **The Journal of biological chemistry** 280, 36417-36428.
149. **Huang M., Orenstein J.M., Martin M.A., Freed E.O.**, 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. **Journal of virology** 69, 6810-6818.
150. **Hughes S.H.**, 2001. Molecular matchmaking: NNRTIs can enhance the dimerization of HIV type 1 reverse transcriptase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98, 6991-6992.

151. **Hugle T., Fehrmann F., Bieck E., Kohara M., Krausslich H.G., Rice C.M., Blum H.E., Moradpour D.**, 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. **Virology** 284, 70-81.
152. **Hussain A., Wesley C., Khalid M., Chaudhry A., Jameel S.**, 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. **Journal of virology** 82, 893-902.
153. **Hussain Z.**, 2013. Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment.
154. **Ivashkina N., Wolk B., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum H.E., Penin F., Moradpour D.**, 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. **Journal of virology** 76, 13088-13093.
155. **Janssens W., Buve A., Nkengasong J.N.**, 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. **AIDS (London, England)** 11, 705-712.
156. **Janssens W., Heyndrickx L., Fransen K., Motte J., Peeters M., Nkengasong J.N., Ndumbe P.M., Delaporte E., Perret J.L., Atende C., et al.**, 1994. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. **AIDS research and human retroviruses** 10, 877-879.
157. **Jaskolski M., Alexandratos J.N., Bujacz G., Wlodawer A.**, 2009. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. **The FEBS journal** 276, 2926-2946.
158. **Jauffret-Roustide M., Le Strat Y., Couturier E., Thierry D., Rondy M., Quaglia M., Razafandratsima N., Emmanuelli J., Guibert G., Barin F., Desenclos J.C.**, 2009. A national cross-sectional study among drug-users in France: epidemiology of HCV and highlight on practical and statistical aspects of the design. **BMC infectious diseases** 9, 113.
159. **Jeannel D., Fretz C., Traore Y., Kohdjo N., Bigot A., Pe Gamy E., Jourdan G., Kourouma K., Maertens G., Fumoux F., Fournel J.J., Stuyver L.**, 1998. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. **Journal of medical virology** 55, 92-97.
160. **Jennings T.A., Chen Y., Sikora D., Harrison M.K., Sikora B., Huang L., Jankowsky E., Fairman M.E., Cameron C.E., Raney K.D.**, 2008. RNA

- unwinding activity of the hepatitis C virus NS3 helicase is modulated by the NS5B polymerase. **Biochemistry** 47, 1126-1135.
161. **Jetzt A.E., Yu H., Klarmann G.J., Ron Y., Preston B.D., Dougherty J.P., 2000.** High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. **Journal of virology** 74, 1234-1240.
162. **Jirasko V., Montserret R., Appel N., Janvier A., Eustachi L., Brohm C., Steinmann E., Pietschmann T., Penin F., Bartenschlager R., 2008.** Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. **The Journal of biological chemistry** 283, 28546-28562.
163. **Johnson A.A., Santos W., Pais G.C., Marchand C., Amin R., Burke T.R., Jr., Verdine G., Pommier Y., 2006.** Integration requires a specific interaction of the donor DNA terminal 5'-cytosine with glutamine 148 of the HIV-1 integrase flexible loop. **The Journal of biological chemistry** 281, 461-467.
164. **Jones C.T., Murray C.L., Eastman D.K., Tassello J., Rice C.M., 2007.** Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **Journal of virology** 81, 8374-8383.
165. **Jopling C.L., Yi M., Lancaster A.M., Lemon S.M., Sarnow P., 2005.** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. **Science (New York, N.Y.)** 309, 1577-1581.
166. **cvJouvenet N., Simon S.M., Bieniasz P.D., 2011.** Visualizing HIV-1 assembly. **Journal of molecular biology** 410, 501-511.
167. **Jung M., Leye N., Vidal N., Fargette D., Diop H., Toure Kane C., Gascuel O., Peeters M., 2012.** The origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Senegal. **PloS one** 7, e33579.
168. **Kageyama S., Agdamag D.M., Alesna E.T., Leano P.S., Heredia A.M., Abellanosa-Tac-An I.P., Jereza L.D., Tanimoto T., Yamamura J., Ichimura H., 2006.** A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. **Journal of medical virology** 78, 1423-1428.
169. **Kaito M., Watanabe S., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., Kobayashi Y., Konishi M., Yokoi M., Ishida S., Suzuki S., Kohara M., 1994.** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **The Journal of general virology** 75 (Pt 7), 1755-1760.
170. **Kaleebu P., French N., Mahe C., Yirrell D., Watera C., Lyagoba F., Nakiyingi J., Rutebemberwa A., Morgan D., Weber J., Gilks C., Whitworth J., 2002.** Effect

- of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. **The Journal of infectious diseases** 185, 1244-1250.
171. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O., 2002. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. **Journal of virology** 76, 4034-4043.
172. Kalish M.L., Wolfe N.D., Ndongmo C.B., McNicholl J., Robbins K.E., Aidoo M., Fonjungo P.N., Alemnji G., Zeh C., Djoko C.F., Mpoudi-Ngole E., Burke D.S., Folks T.M., 2005. Central African hunters exposed to simian immunodeficiency virus. **Emerging infectious diseases** 11, 1928-1930.
173. Kamal S.M., 2009. Hepatitis C genotype 4 therapy: increasing options and improving outcomes. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver** 29 Suppl 1, 39-48.
174. Kamal S.M., El Tawil A.A., Nakano T., He Q., Rasenack J., Hakam S.A., Saleh W.A., Ismail A., Aziz A.A., Madwar M.A., 2005. Peginterferon {alpha}-2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. **Gut** 54, 858-866.
175. Karim S.S., Kashuba A.D., Werner L., Karim Q.A., 2011. Drug concentrations after topical and oral antiretroviral pre-exposure prophylaxis: implications for HIV prevention in women. **Lancet** 378, 279-281.
176. Karn J., Stoltzfus C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine** 2, a006916.
177. Kaul A., Stauffer S., Berger C., Pertel T., Schmitt J., Kallis S., Zayas M., Lohmann V., Luban J., Bartenschlager R., 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. **PLoS pathogens** 5, e1000546.
178. Keele B.F., Van Heuverswyn F., Li Y., Bailes E., Takehisa J., Santiago M.L., Bibollet-Ruche F., Chen Y., Wain L.V., Liegeois F., Loul S., Ngole E.M., Bienvenue Y., Delaporte E., Brookfield J.F., Sharp P.M., Shaw G.M., Peeters M., Hahn B.H., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science (New York, N.Y.)** 313, 523-526.

179. **Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A., Steitz T.A.**, 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. **Science (New York, N.Y.)** 256, 1783-1790.
180. **Kolykhalov A.A., Feinstone S.M., Rice C.M.**, 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. **Journal of virology** 70, 3363-3371.
181. **Komurian-Pradel F., Rajoharison A., Berland J.L., Khouri V., Perret M., Van Roosmalen M., Pol S., Negro F., Paranhos-Baccala G.**, 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 40, 900-909.
182. **Kondo E., Mammano F., Cohen E.A., Gottlinger H.G.**, 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. **Journal of virology** 69, 2759-2764.
183. **Korber B., Theiler J., Wolinsky S.**, 1998. Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. **Science (New York, N.Y.)** 280, 1868-1871.
184. **Korenromp E.L., Williams B.G., Schmid G.P., Dye C.**, 2009. Clinical prognostic value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection—a quantitative review. **PloS one** 4, e5950.
185. **Kostrikis L.G., Bagdades E., Cao Y., Zhang L., Dimitriou D., Ho D.D.**, 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. **Journal of virology** 69, 6122-6130.
186. **Kourteva Y., De Pasquale M., Allos T., McMunn C., D'Aquila R.T.**, 2012. APOBEC3G expression and hypermutation are inversely associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) burden in vivo. **Virology** 430, 1-9.
187. **Koutsoudakis G., Kaul A., Steinmann E., Kallis S., Lohmann V., Pietschmann T., Bartenschlager R.**, 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. **Journal of virology** 80, 5308-5320.
188. **Krausslich H.G., Facke M., Heuser A.M., Konvalinka J., Zentgraf H.**, 1995. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. **Journal of virology** 69, 3407-3419.

189. **Kuiken C., Yusim K., Boykin L., Richardson R., 2005.** The Los Alamos hepatitis C sequence database. **Bioinformatics (Oxford, England)** 21, 379-384.
190. **Kuiken C.L., Zwart G., Baan E., Coutinho R.A., van den Hoek J.A., Goudsmit J., 1993.** Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90, 9061-9065.
191. **Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N., Kurbanova-Khudayberganova D., Khikmatullaeva A., Musabaev E., Mizokami M., 2008a.** Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology** 38, 457-464.
192. **Kurbanov F., Tanaka Y., Chub E., Maruyama I., Azlarova A., Kamitsukasa H., Ohno T., Bonetto S., Moreau I., Fanning L.J., Legrand-Abravanel F., Izopet J., Naoumov N., Shimada T., Netesov S., Mizokami M., 2008b.** Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1_2k/1b. **The Journal of infectious diseases** 198, 1448-1456.
193. **Laguno M., Larrousse M., Murillas J., Blanco J.L., Leon A., Milinkovic A., Lonca M., Martinez E., Sanchez-Tapias J.M., de Lazzari E., Gatell J.M., Costa J., Mallolas J., 2007.** Predictive value of early virologic response in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients treated with an interferon-based regimen plus ribavirin. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 44, 174-178.
194. **Lan K.H., Lan K.L., Lee W.P., Sheu M.L., Chen M.Y., Lee Y.L., Yen S.H., Chang F.Y., Lee S.D., 2007.** HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. **Journal of hepatology** 46, 759-767.
195. **Laukkanen T., Albert J., Liitsola K., Green S.D., Carr J.K., Leitner T., McCutchan F.E., Salminen M.O., 1999.** Virtually full-length sequences of HIV type 1 subtype J reference strains. **AIDS research and human retroviruses** 15, 293-297.
196. **Lavillette D., Pecheur E.I., Donot P., Fresquet J., Molle J., Corbau R., Dreux M., Penin F., Cosset F.L., 2007.** Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. **Journal of virology** 81, 8752-8765.

197. **Le Rouzic E., Benichou S.**, 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. **Retrovirology** 2, 11.
198. **Le Rouzic E., Mousnier A., Rustum C., Stutz F., Hallberg E., Dargemont C., Benichou S.**, 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. **The Journal of biological chemistry** 277, 45091-45098.
199. **Lee Y.M., Lin H.J., Chen Y.J., Lee C.M., Wang S.F., Chang K.Y., Chen T.L., Liu H.F., Chen Y.M.**, 2010. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w. **Journal of medical virology** 82, 57-68.
200. **Leelawiwat W., Young N.L., Chaowanachan T., Ou C.Y., Culnane M., Vanprapa N., Waranawat N., Wasinrapee P., Mock P.A., Tappero J., McNicholl J.M.**, 2009. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. **Journal of virological methods** 155, 109-117.
201. **Legrand-Abravanel F., Claudinon J., Nicot F., Dubois M., Chapuy-Regaud S., Sandres-Saune K., Pasquier C., Izopet J.**, 2007. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. **Journal of virology** 81, 4357-4362.
202. **Legrand-Abravanel F., Nicot F., Boulestin A., Sandres-Saune K., Vinel J.P., Alric L., Izopet J.**, 2005. Pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus genotype 4 infection. **Journal of medical virology** 77, 66-69.
203. **Legrand-Abravanel F., Sandres-Saune K., Barange K., Alric L., Moreau J., Desmorat P., Vinel J.P., Izopet J.**, 2004. Hepatitis C virus genotype 5: epidemiological characteristics and sensitivity to combination therapy with interferon-alpha plus ribavirin. **The Journal of infectious diseases** 189, 1397-1400.
204. **Lepretre A., Ba I., Lacombe K., Maynard M., Toufik A., Ndiaye O., Kane C.T., Gozlan J., Tine J., Ndoeye I., Raguin G., Girard P.M.**, 2015. Prevalence and behavioural risks for HIV and HCV infections in a population of drug users of Dakar, Senegal: the ANRS 12243 UDSEN study. **Journal of the International AIDS Society** 18, 19888.
205. **Levy J.A., Hoffman A.D., Kramer S.M., Landis J.A., Shimabukuro J.M., Oshiro L.S.**, 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science (New York, N.Y.)** 225, 840-842.

206. **Li L., Li H.S., Pauza C.D., Bukrinsky M., Zhao R.Y.**, 2005. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. **Cell research** 15, 923-934.
207. **Li X.Y., Guo F., Zhang L., Kleiman L., Cen S.**, 2007. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. **The Journal of biological chemistry** 282, 32065-32074.
208. **Liegeois F., Boue V., Butel C., Mouinga-Ondeme A., Sica J., Zamba C., Peeters M., Delaporte E., Rouet F.**, 2013. HIV type-1 group O infection in Gabon: low prevalence rate but circulation of genetically diverse and drug-resistant HIV type-1 group O strains. **AIDS research and human retroviruses** 29, 1085-1090.
209. **Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M.**, 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science (New York, N.Y.)** 309, 623-626.
210. **Liu CH, Liang CC, Liu CJ, Lin CL, Su TH, Yang HC, Chen PJ, Chen DS, Kao JH.** Comparison of Abbott RealTime HCV Genotype II with Versant Line Probe Assay 2.0 for Hepatitis C Virus Genotyping, **J Clin Microbiol** 53: 1754-1757.
211. **Liu S., Yang W., Shen L., Turner J.R., Coyne C.B., Wang T.**, 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. **Journal of virology** 83, 2011-2014.
212. **Loemba H., Brenner B., Parniak M.A., Ma'ayan S., Spira B., Moisi D., Oliveira M., Detorio M., Wainberg M.A.**, 2002. Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 46, 2087-2094.
213. **Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R.**, 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science (New York, N.Y.)** 285, 110-113.
214. **Lorenz I.C., Marcotrigiano J., Dentzer T.G., Rice C.M.**, 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. **Nature** 442, 831-835
215. **Luik P., Chew C., Aittoniemi J., Chang J., Wentworth P., Jr., Dwek R.A., Biggin P.C., Venien-Bryan C., Zitzmann N.**, 2009. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. **Proceedings of the**

- National Academy of Sciences of the United States of America** 106, 12712-12716.
216. **Lundin M., Lindstrom H., Gronwall C., Persson M.A.**, 2006. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. **The Journal of general virology** 87, 3263-3272.
217. **Ma Y., Yates J., Liang Y., Lemon S.M., Yi M.**, 2008. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. **Journal of virology** 82, 7624-7639.
218. **Mamadou S., Vidal N., Montavon C., Ben A., Djibo A., Rabiou S., Soga G., Delaporte E., Mboup S., Peeters M.**, 2003. Emergence of complex and diverse CRF02-AG/CRF06-cpx recombinant HIV type 1 strains in Niger, West Africa. **AIDS research and human retroviruses** 19, 77-82.
219. **Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., Goodman Z.D., Koury K., Ling M., Albrecht J.K.**, 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet** 358, 958-965.
220. **Mansky L.M., Preveral S., Selig L., Benarous R., Benichou S.**, 2000. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. **Journal of virology** 74, 7039-7047.
221. **Mao H., Zhang H., Zhang H., Zhao J., Lu Z., Jin G., Gu S., Wang H., Wang Y.**, 2010. Clinical evaluation of a colorimetric oligonucleotide chip for genotyping hepatitis C virus. **Clinical biochemistry** 43, 214-219.
222. **Markov P.V., Pepin J., Frost E., Deslandes S., Labbe A.C., Pybus O.G.**, 2009. Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. **The Journal of general virology** 90, 2086-2096.
223. **Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gomez J.**, 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **Journal of virology** 66, 3225-3229.
224. **Martial J., Morice Y., Abel S., Cabie A., Rat C., Lombard F., Edouard A., Pierre-Louis S., Garsaud P., Bera O., Chout R., Gordien E., Deny P., Cesaire R.**, 2004. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in the Caribbean island of Martinique:

- evidence for a large radiation of HCV-2 and for a recent introduction from Europe of HCV-4. **Journal of clinical microbiology** 42, 784-791.
225. **Martinot-Peignoux M., Roudot-Thoraval F., Mendel I., Coste J., Izopet J., Duverlie G., Payan C., Pawlotsky J.M., Defer C., Bogard M., Gerolami V., Halfon P., Buisson Y., Fouqueray B., Loiseau P., Lamoril J., Lefrere J.J., Marcellin P.**, 1999. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. **Journal of viral hepatitis** 6, 435-443.
226. **Martro E., Gonzalez V., Buckton A.J., Saludes V., Fernandez G., Matas L., Planas R., Ausina V.**, 2008. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. **Journal of clinical microbiology** 46, 192-197.
227. **Mateu M.G.**, 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. **The FEBS journal** 276, 6098-6109.
228. **Matusali G., Potesta M., Santoni A., Cerboni C., Doria M.**, 2012. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. **Journal of virology** 86, 4496-4504.
229. **McCutchan F.E., Carr J.K., Bajani M., Sanders-Buell E., Harry T.O., Stoeckli T.C., Robbins K.E., Gashau W., Nasidi A., Janssens W., Kalish M.L.**, 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. **Virology** 254, 226-234.
230. **McCutchan F.E., Salminen M.O., Carr J.K., Burke D.S.**, 1996. HIV-1 genetic diversity. **AIDS (London, England)** 10 Suppl 3, S13-20.
231. **McLauchlan J., Lemberg M.K., Hope G., Martoglio B.**, 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **The EMBO journal** 21, 3980-3988.
232. **McMahon J.M., Pouget E.R., Tortu S.**, 2007. Individual and couple-level risk factors for hepatitis C infection among heterosexual drug users: a multilevel dyadic analysis. **The Journal of infectious diseases** 195, 1572-1581.
233. **McOmish F., Yap P.L., Dow B.C., Follett E.A., Seed C., Keller A.J., Cobain T.J., Krusius T., Kolho E., Naukkarinen R., et al.**, 1994. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **Journal of clinical microbiology** 32, 884-892.

234. **Melikyan G.B., Markosyan R.M., Hemmati H., Delmedico M.K., Lambert D.M., Cohen F.S.**, 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. **The Journal of cell biology** 151, 413-423.
235. **Mellor J., Holmes E.C., Jarvis L.M., Yap P.L., Simmonds P.**, 1995. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. **The Journal of general virology** 76 (Pt 10), 2493-2507.
236. **Mellors J.W., Munoz A., Giorgi J.V., Margolick J.B., Tassoni C.J., Gupta P., Kingsley L.A., Todd J.A., Saah A.J., Detels R., Phair J.P., Rinaldo C.R., Jr.**, 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. **Annals of internal medicine** 126, 946-954.
237. **Miller M.D., Warmerdam M.T., Gaston I., Greene W.C., Feinberg M.B.**, 1994. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. **The Journal of experimental medicine** 179, 101-113.
238. **Miller R.H., Purcell R.H.**, 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 87, 2057-2061.
239. **Misumi S., Inoue M., Dochi T., Kishimoto N., Hasegawa N., Takamune N., Shoji S.**, 2010. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. **The Journal of biological chemistry** 285, 25185-25195.
240. **Mitchell R.S., Beitzel B.F., Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C.C., Ecker J.R., Bushman F.D.**, 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. **PLoS biology** 2, E234.
241. **Mitchell R.S., Katsura C., Skasko M.A., Fitzpatrick K., Lau D., Ruiz A., Stephens E.B., Margottin-Goguet F., Benarous R., Guatelli J.C.**, 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. **PLoS pathogens** 5, e1000450.
242. **Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K.**, 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature cell biology** 9, 1089-1097.

243. **Mizokami M., Tanaka Y., Miyakawa Y.**, 2006. Spread times of hepatitis C virus estimated by the molecular clock differ among Japan, the United States and Egypt in reflection of their distinct socioeconomic backgrounds. **Intervirology** 49, 28-36.
244. **Mondor I., Ugolini S., Sattentau Q.J.**, 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. **Journal of virology** 72, 3623-3634.
245. **Montano M.A., Novitsky V.A., Blackard J.T., Cho N.L., Katzenstein D.A., Essex M.**, 1997. Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. **Journal of virology** 71, 8657-8665.
246. **Moore J.P.**, 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. **Science (New York, N.Y.)** 276, 51-52.
247. **Moradpour D., Brass V., Bieck E., Friebe P., Gosert R., Blum H.E., Bartenschlager R., Penin F., Lohmann V.**, 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. **Journal of virology** 78, 13278-13284.
248. **Moradpour D., Penin F., Rice C.M.**, 2007. Replication of hepatitis C virus. **Nature reviews. Microbiology** 5, 453-463.
249. **Moreau I., Hegarty S., Levis J., Sheehy P., Crosbie O., Kenny-Walsh E., Fanning L.J.**, 2006. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. **Virology journal** 3, 95.
250. **Morice Y., Roulot D., Grando V., Stirnemann J., Gault E., Jeantils V., Bentata M., Jarrousse B., Lortholary O., Pallier C., Deny P.**, 2001. Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. **The Journal of general virology** 82, 1001-1012.
251. **Mulky A., Kappes J.C.**, 2005. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase subunit structure/function in the context of infectious virions and human target cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 49, 3762-3769.
252. **Murakami T.**, 2012. Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions. **Molecular biology international** 2012, 682850.

253. **Murakami T., Ablan S., Freed E.O., Tanaka Y.**, 2004. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. **Journal of virology** 78, 1026-1031.
254. **Murao K., Imachi H., Yu X., Cao W.M., Nishiuchi T., Chen K., Li J., Ahmed R.A., Wong N.C., Ishida T.**, 2008. Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. **Gut** 57, 664-671.
255. **Murphy D.G., Willems B., Deschenes M., Hilzenrat N., Mousseau R., Sabbah S.**, 2007. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. **Journal of clinical microbiology** 45, 1102-1112.
256. **Nakatani S.M., Santos C.A., Riediger I.N., Krieger M.A., Duarte C.A., Lacerda M.A., Biondo A.W., Carrilho F.J., Ono-Nita S.K.**, 2010. Development of hepatitis C virus genotyping by real-time PCR based on the NS5B region. **PLoS one** 5, e10150.
257. **Nasioulas G., Paraskevis D., Magiorkinis E., Theodoridou M., Hatzakis A.**, 1999. Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: evidence of A/G/I recombination. **AIDS research and human retroviruses** 15, 745-758.
258. **Navare A.T., Sova P., Purdy D.E., Weiss J.M., Wolf-Yadlin A., Korth M.J., Chang S.T., Proll S.C., Jahan T.A., Krasnoselsky A.L., Palermo R.E., Katze M.G.**, 2012. Quantitative proteomic analysis of HIV-1 infected CD4+ T cells reveals an early host response in important biological pathways: protein synthesis, cell proliferation, and T-cell activation. **Virology** 429, 37-46.
259. **Navas M.C., Fuchs A., Schvoerer E., Bohbot A., Aubertin A.M., Stoll-Keller F.**, 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. **Journal of medical virology** 67, 152-161.
260. **Ndiaye H.D., Tchiakpe E., Vidal N., Ndiaye O., Diop A.K., Peeters M., Mboup S., Toure-Kane C.**, 2013. HIV type 1 subtype C remains the predominant subtype in men having sex with men in Senegal. **AIDS research and human retroviruses** 29, 1265-1272.
261. **Ndiaye H.D., Toure-Kane C., Vidal N., Niama F.R., Niang-Diallo P.A., Dieye T., Gaye-Diallo A., Wade A.S., Peeters M., Mboup S.**, 2009. Surprisingly high prevalence of subtype C and specific HIV-1 subtype/CRF distribution in men

- having sex with men in Senegal. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 52, 249-252.
262. **Neogi U., Sood V., Ronsard L., Singh J., Lata S., Ramachandran V.G., Das S., Wanchu A., Banerjea A.C.**, 2011. Genetic architecture of HIV-1 genes circulating in north India & their functional implications. **The Indian journal of medical research** 134, 769-778.
263. **Nielsen M.H., Pedersen F.S., Kjems J.**, 2005. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. **Retrovirology** 2, 10.
264. **Nisole S., Saib A.**, 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology** 1, 9.
265. **Nitahara-Kasahara Y., Kamata M., Yamamoto T., Zhang X., Miyamoto Y., Muneta K., Iijima S., Yoneda Y., Tsunetsugu-Yokota Y., Aida Y.**, 2007. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. **Journal of virology** 81, 5284-5293.
266. **Njouom R., Frost E., Deslandes S., Mamadou-Yaya F., Labbe A.C., Pouillot R., Mbelesso P., Mbadingai S., Rousset D., Pepin J.**, 2009. Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. **The Journal of general virology** 90, 2452-2456.
267. **Njouom R., Nerrienet E., Dubois M., Lachenal G., Rousset D., Vessiere A., Ayouba A., Pasquier C., Pouillot R.**, 2007. The hepatitis C virus epidemic in Cameroon: genetic evidence for rapid transmission between 1920 and 1960. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases** 7, 361-367.
268. **Njouom R., Pasquier C., Ayouba A., Gessain A., Froment A., Mfoupouendoun J., Pouillot R., Dubois M., Sandres-Saune K., Thonnon J., Izopet J., Nerrienet E.**, 2003. High rate of hepatitis C virus infection and predominance of genotype 4 among elderly inhabitants of a remote village of the rain forest of South Cameroon. **Journal of medical virology** 71, 219-225.
269. **Njouom R., Sartre M.T., Timba I., Nerrienet E., Tchendjou P., Pasquier C., Rousset D.**, 2008. Efficacy and safety of peginterferon alpha-2a/ribavirin in treatment-naive Cameroonian patients with chronic hepatitis C. **Journal of medical virology** 80, 2079-2085.

270. **Nolte F.S., Boysza J., Thurmond C., Clark W.S., Lennox J.L.**, 1998. Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **Journal of clinical microbiology** 36, 716-720.
271. **Noppornpanth S., Lien T.X., Poovorawan Y., Smits S.L., Osterhaus A.D., Haagmans B.L.**, 2006. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. **Journal of virology** 80, 7569-7577.
272. **Nowotny M.**, 2009. Retroviral integrase superfamily: the structural perspective. **EMBO reports** 10, 144-151.
273. **Ogata N., Alter H.J., Miller R.H., Purcell R.H.**, 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88, 3392-3396.
274. **Ohno T., Mizokami M., Tibbs C.J., Ohba K., Suzuki K., Wu R.R., Nouri-Aria K.T., Williams R.**, 1994. New genotype of hepatitis C virus in South Africa. **Journal of medical virology** 42, 409-413.
275. **Okuda M., Hino K., Korenaga M., Yamaguchi Y., Katoh Y., Okita K.**, 1999. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 29, 217-222.
276. **Okuda M., Li K., Beard M.R., Showalter L.A., Scholle F., Lemon S.M., Weinman S.A.**, 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. **Gastroenterology** 122, 366-375.
277. **Ono A.**, 2009. HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. **Future virology** 4, 241-257.
278. **Op De Beeck A., Cocquerel L., Dubuisson J.**, 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **The Journal of general virology** 82, 2589-2595.
279. **Owsianka A.M., Timms J.M., Tarr A.W., Brown R.J., Hickling T.P., Szwejk A., Bienkowska-Szewczyk K., Thomson B.J., Patel A.H., Ball J.K.**, 2006. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. **Journal of virology** 80, 8695-8704.
280. **Pancera M., Lebowitz J., Schon A., Zhu P., Freire E., Kwong P.D., Roux K.H., Sodroski J., Wyatt R.**, 2005. Soluble mimetics of human immunodeficiency virus

- type 1 viral spikes produced by replacement of the native trimerization domain with a heterologous trimerization motif: characterization and ligand binding analysis. **Journal of virology** 79, 9954-9969.
281. **Pang P.S., Planet P.J., Glenn J.S.**, 2009. The evolution of the major hepatitis C genotypes correlates with clinical response to interferon therapy. **PloS one** 4, e6579.
282. **Parekh B., Phillips S., Granade T.C., Baggs J., Hu D.J., Respess R.**, 1999. Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. **AIDS research and human retroviruses** 15, 133-142.
283. **Park J.C., Kim J.M., Kwon O.J., Lee K.R., Chai Y.G., Oh H.B.**, 2010. Development and clinical evaluation of a microarray for hepatitis C virus genotyping. **Journal of virological methods** 163, 269-275.
284. **Parris G.E.**, 2007. How did the ancestral HIV-1 group M retrovirus get to Leopoldville from southeastern Cameroon? **Medical hypotheses** 69, 1098-1101.
285. **Parry J.V., Mortimer P.P., Perry K.R., Pillay D., Zuckerman M.**, 2003. Towards error-free HIV diagnosis: guidelines on laboratory practice. **Communicable disease and public health / PHLS** 6, 334-350.
286. **Pasquier C., Njouom R., Ayouba A., Dubois M., Sartre M.T., Vessiere A., Timba I., Thonnon J., Izopet J., Nerrienet E.**, 2005. Distribution and heterogeneity of hepatitis C genotypes in hepatitis patients in Cameroon. **Journal of medical virology** 77, 390-398.
287. **Pawlotsky J.M.**, 2014. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. **Gastroenterology** 146, 1176-1192.
288. **Payan C., Roudot-Thoraval F., Marcellin P., Bled N., Duverlie G., Fouchard-Hubert I., Trimoulet P., Couzigou P., Cointe D., Chaput C., Henquell C., Abergel A., Pawlotsky J.M., Hezode C., Coude M., Bianchi A., Alain S., Loustaud-Ratti V., Chevallier P., Trepo C., Gerolami V., Portal I., Halfon P., Bourliere M., Bogard M., Plouvier E., Laffont C., Agius G., Silvain C., Brodard V., Thieffin G., Buffet-Janvresse C., Riachi G., Grattard F., Bourlet T., Stoll-Keller F., Doffoel M., Izopet J., Barange K., Martinot-Peignoux M., Branger M., Rosenberg A., Sogni P., Chaix M.L., Pol S., Thibault V., Opolon P., Charrois A., Serfaty L., Fouqueray B., Grange J.D., Lefrere J.J., Lunel-Fabiani F.**, 2005. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at

- the beginning of the third millenium: The GEMHEP GenoCII Study. **Journal of viral hepatitis** 12, 405-413.
289. **Peeters M., Chaix M.L., Delaporte E.**, 2008. [Genetic diversity and phylogeographic distribution of SIV: how to understand the origin of HIV]. **Medecine sciences : M/S** 24, 621-628.
290. **Peeters M., Liegeois F., Torimiro N., Bourgeois A., Mpoudi E., Vergne L., Saman E., Delaporte E., Saragosti S.**, 1999. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. **Journal of virology** 73, 7368-7375.
291. **Penin F., Brass V., Appel N., Ramboarina S., Montserret R., Ficheux D., Blum H.E., Bartenschlager R., Moradpour D.**, 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **The Journal of biological chemistry** 279, 40835-40843.
292. **Penin F., Combet C., Germanidis G., Frainais P.O., Deleage G., Pawlotsky J.M.**, 2001. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. **Journal of virology** 75, 5703-5710.
293. **Perez-Caballero D., Zang T., Ebrahimi A., McNatt M.W., Gregory D.A., Johnson M.C., Bieniasz P.D.**, 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. **Cell** 139, 499-511.
294. **Perkins N.D., Edwards N.L., Duckett C.S., Agranoff A.B., Schmid R.M., Nabel G.J.**, 1993. A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. **The EMBO journal** 12, 3551-3558.
295. **Perlemuter G., Sabile A., Letteron P., Vona G., Topilco A., Chretien Y., Koike K., Pessayre D., Chapman J., Barba G., Brechot C.**, 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** 16, 185-194.
296. **Pierson T.C., Doms R.W.**, 2003. HIV-1 entry and its inhibition. **Current topics in microbiology and immunology** 281, 1-27.
297. **Pietschmann T., Kaul A., Koutsoudakis G., Shavinskaya A., Kallis S., Steinmann E., Abid K., Negro F., Dreux M., Cosset F.L., Bartenschlager R.**, 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and

- intergenotypic hepatitis C virus chimeras. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103, 7408-7413.
298. **Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G., Abrignani S.**, 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science (New York, N.Y.)** 282, 938-941.
299. **Plamondon M., Labbe A.C., Frost E., Deslandes S., Alves A.C., Bastien N., Pepin J.**, 2007. Hepatitis C virus infection in Guinea-Bissau: a sexually transmitted genotype 2 with parenteral amplification? **PLoS one** 2, e372.
300. **Plantier J.C., Leoz M., Dickerson J.E., De Oliveira F., Cordonnier F., Leme V., Damond F., Robertson D.L., Simon F.**, 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature medicine** 15, 871-872.
301. **Ploss A., Evans M.J., Gaysinskaya V.A., Panis M., You H., de Jong Y.P., Rice C.M.**, 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature** 457, 882-886.
302. **Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N.**, 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. **The EMBO journal** 8, 3867-3874.
303. **Pohlmann S., Soilleux E.J., Baribaud F., Leslie G.J., Morris L.S., Trowsdale J., Lee B., Coleman N., Doms R.W.**, 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98, 2670-2675.
304. **Pollard V.W., Malim M.H.**, 1998. The HIV-1 Rev protein. **Annual review of microbiology** 52, 491-532.
305. **Pomerantz R.J.**, 2002. Eliminating HIV-1 reservoirs. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)** 3, 1133-1137.
306. **Pond S.J., Ridgeway W.K., Robertson R., Wang J., Millar D.P.**, 2009. HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 106, 1404-1408.
307. **Popovic M., Sarngadharan M.G., Read E., Gallo R.C.**, 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science (New York, N.Y.)** 224, 497-500.

308. **Poynard T., Marcellin P., Lee S.S., Niederau C., Minuk G.S., Ideo G., Bain V., Heathcote J., Zeuzem S., Trepo C., Albrecht J.**, 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet** 352, 1426-1432.
309. **Prabdi-Sing N., Puren A.J., Mahlangu J., Barrow P., Bowyer S.M.**, 2008. Hepatitis C virus genotypes in two different patient cohorts in Johannesburg, South Africa. **Archives of virology** 153, 2049-2058.
310. **Preston B.D., Poiesz B.J., Loeb L.A.**, 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. **Science (New York, N.Y.)** 242, 1168-1171.
311. **Pybus O.G., Charleston M.A., Gupta S., Rambaut A., Holmes E.C., Harvey P.H.**, 2001. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. **Science (New York, N.Y.)** 292, 2323-2325.
312. **Rambaut A., Posada D., Crandall K.A., Holmes E.C.**, 2004. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature reviews. Genetics** 5, 52-61.
313. **Ramirez B.C., Simon-Loriere E., Galetto R., Negroni M.**, 2008. Implications of recombination for HIV diversity. **Virus research** 134, 64-73.
314. **Ray R.B., Lagging L.M., Meyer K., Ray R.**, 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. **Journal of virology** 70, 4438-4443.
315. **Ray S.C., Arthur R.R., Carella A., Bukh J., Thomas D.L.**, 2000. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout egypt. **The Journal of infectious diseases** 182, 698-707.
316. **Reid S.R.**, 2009. Injection drug use, unsafe medical injections, and HIV in Africa: a systematic review. **Harm reduction journal** 6, 24.
317. **Rhinds D., Brissette L.**, 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. **The international journal of biochemistry & cell biology** 36, 39-77.
318. **Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A.**, 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science (New York, N.Y.)** 242, 1171-1173.
319. **Robertson B., Myers G., Howard C., Brettin T., Bukh J., Gaschen B., Gojobori T., Maertens G., Mizokami M., Nainan O., Netesov S., Nishioka K., Shin i T., Simmonds P., Smith D., Stuyver L., Weiner A.**, 1998. Classification,

- nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. **Archives of virology** 143, 2493-2503.
320. **Robertson D.L., Sharp P.M., McCutchan F.E., Hahn B.H.**, 1995. Recombination in HIV-1. **Nature** 374, 124-126.
321. **Rocha-Perugini V., Montpellier C., Delgrange D., Wychowski C., Helle F., Pillez A., Drobecq H., Le Naour F., Charrin S., Levy S., Rubinstein E., Dubuisson J., Cocquerel L.**, 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. **PLoS one** 3, e1866.
322. **Rodes B., Sheldon J., Toro C., Cuevas L., Perez-Pastrana E., Herrera I., Soriano V.**, 2007. Quantitative detection of plasma human immunodeficiency virus type 2 subtype A RNA by the Nuclisens EasyQ Assay (version 1.1). **Journal of clinical microbiology** 45, 88-92.
323. **Roeth J.F., Collins K.L.**, 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR** 70, 548-563.
324. **Roingard P., Hourieux C.**, 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. **Journal of viral hepatitis** 15, 157-164.
325. **Roohvand F., Maillard P., Lavergne J.P., Boulant S., Walic M., Andreo U., Goueslain L., Helle F., Mallet A., McLauchlan J., Budkowska A.**, 2009. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. **The Journal of biological chemistry** 284, 13778-13791.
326. **Roques P., Robertson D.L., Souquiere S., Apetrei C., Nerrienet E., Barre-Sinoussi F., Muller-Trutwin M., Simon F.**, 2004. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. **AIDS (London, England)** 18, 1371-1381.
327. **Ross R.S., Verbeeck J., Viazov S., Lemey P., Van Ranst M., Roggendorf M.**, 2008a. Evidence for a complex mosaic genome pattern in a full-length hepatitis C virus sequence. **Evolutionary bioinformatics online** 4, 249-254.
328. **Ross R.S., Viazov S., Wolters B., Roggendorf M.**, 2008b. Towards a better resolution of hepatitis C virus variants: CLIP sequencing of an HCV core fragment and automated assignment of genotypes and subtypes. **Journal of virological methods** 148, 25-33.

329. Rouet F., Foulongne V., Viljoen J., Steegen K., Becquart P., Valea D., Danaviah S., Segondy M., Verhofstede C., Van de Perre P., 2010. Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. **Journal of virological methods** 163, 253-257.
330. Ruelle J., Mukadi B.K., Schutten M., Goubau P., 2004. Quantitative real-time PCR on Lightcycler for the detection of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). **Journal of virological methods** 117, 67-74.
331. Ruffin N., Borggren M., Euler Z., Fiorino F., Gruppung K., Hallengard D., Javed A., Mendonca K., Pollard C., Reinhart D., Saba E., Sheik-Khalil E., Skold A., Ziglio S., Scarlatti G., Gotch F., Wahren B., Shattock R.J., 2012. Rational design of HIV vaccines and microbicides: report of the EUROPRISE annual conference 2011. **Journal of translational medicine** 10, 144.
332. Ruggieri A., Argentini C., Kouruma F., Chionne P., D'Ugo E., Spada E., Dettori S., Sabbatani S., Rapicetta M., 1996. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). **The Journal of general virology** 77 (Pt 9), 2073-2076.
333. Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution** 4, 406-425.
334. Sakai A., Claire M.S., Faulk K., Govindarajan S., Emerson S.U., Purcell R.H., Bukh J., 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100, 11646-11651.
335. Salemi M., Vandamme A.M., 2002. Hepatitis C virus evolutionary patterns studied through analysis of full-genome sequences. **Journal of molecular evolution** 54, 62-70.
336. Salminen M.O., Carr J.K., Burke D.S., McCutchan F.E., 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. **AIDS research and human retroviruses** 11, 1423-1425.
337. Sandres-Saune K., Deny P., Pasquier C., Thibaut V., Duverlie G., Izopet J., 2003. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. **Journal of virological methods** 109, 187-193.

338. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.**, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74, 5463-5467.
339. **Santos A.F., Soares M.A.**, 2010. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. **Viruses** 2, 503-531.
340. **Santos A.F., Sousa T.M., Soares E.A., Sanabani S., Martinez A.M., Sprinz E., Silveira J., Sabino E.C., Tanuri A., Soares M.A.**, 2006. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS (London, England)** 20, 2011-2019.
341. **Sarafianos S.G., Marchand B., Das K., Himmel D.M., Parniak M.A., Hughes S.H., Arnold E.**, 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. **Journal of molecular biology** 385, 693-713.
342. **Sarasin-Filipowicz M., Krol J., Markiewicz I., Heim M.H., Filipowicz W.**, 2009. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. **Nature medicine** 15, 31-33.
343. **Scarlata S., Carter C.**, 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. **Biochimica et biophysica acta** 1614, 62-72.
344. **Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A.**, 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO journal** 21, 5017-5025.
345. **Schafer A., Bogerd H.P., Cullen B.R.**, 2004. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. **Virology** 328, 163-168.
346. **Scheid J.F., Mouquet H., Feldhahn N., Seaman M.S., Velinzon K., Pietzsch J., Ott R.G., Anthony R.M., Zebroski H., Hurley A., Phogat A., Chakrabarti B., Li Y., Connors M., Pereyra F., Walker B.D., Wardemann H., Ho D., Wyatt R.T., Mascola J.R., Ravetch J.V., Nussenzweig M.C.**, 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature** 458, 636-640.
347. **Scott L.E., Noble L.D., Moloji J., Erasmus L., Venter W.D., Stevens W.**, 2009. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche

- Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 assays. **Journal of clinical microbiology** 47, 2209-2217.
348. **Serebrov V., Pyle A.M.**, 2004. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. **Nature** 430, 476-480.
349. **Shannon K., Rusch M., Morgan R., Oleson M., Kerr T., Tyndall M.W.**, 2008. HIV and HCV prevalence and gender-specific risk profiles of crack cocaine smokers and dual users of injection drugs. **Substance use & misuse** 43, 521-534.
350. **Shehu-Xhilaga M., Crowe S.M., Mak J.**, 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. **Journal of virology** 75, 1834-1841.
351. **Shehu-Xhilaga M., Hill M., Marshall J.A., Kappes J., Crowe S.M., Mak J.**, 2002. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. **Journal of virology** 76, 4331-4340.
352. **Sherman G.G., Stevens G., Jones S.A., Horsfield P., Stevens W.S.**, 2005. Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 38, 615-617.
353. **Simmonds P.**, 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. **The Journal of general virology** 82, 693-712.
354. **Simmonds P.**, 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **The Journal of general virology** 85, 3173-3188.
355. **Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deleage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspe G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlotsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin I.T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A.**, 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 42, 962-973.
356. **Simmonds P., Smith D.B., McOmish F., Yap P.L., Kolberg J., Urdea M.S., Holmes E.C.**, 1994. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. **The Journal of general virology** 75 (Pt 5), 1053-1061.

357. **Simon F., Mauclore P., Roques P., Loussert-Ajaka I., Muller-Trutwin M.C., Saragosti S., Georges-Courbot M.C., Barre-Sinoussi F., Brun-Vezinet F.,** 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature medicine** 4, 1032-1037.
358. **Sire J.M., Vray M., Merzouk M., Plantier J.C., Pavie J., Maylin S., Timsit J., Lascoux-Combe C., Molina J.M., Simon F., Delaugerre C.,** 2011. Comparative RNA quantification of HIV-1 group M and non-M with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 and Abbott Real-Time HIV-1 PCR assays. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)** 56, 239-243.
359. **Sizmann D., Glaubitz J., Simon C.O., Goedel S., Buergisser P., Drogan D., Hesse M., Kroh M., Simmler P., Dewald M., Gilsdorf M., Fuerst M., Ineichen R., Kirn A., Pasche P., Wang Z., Weisshaar S., Young K., Haberhausen G., Babel R.,** 2010. Improved HIV-1 RNA quantitation by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 using a novel dual-target approach. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology** 49, 41-46.
360. **Smith D.B.,** 1999. Evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus. **Journal of viral hepatitis** 6 Suppl 1, 41-46.
361. **Sollis K.A., Smit P.W., Fiscus S., Ford N., Vitoria M., Essajee S., Barnett D., Cheng B., Crowe S.M., Denny T., Landay A., Stevens W., Habiyambere V., Perrins J., Peeling R.W.,** 2014. Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. **PloS one** 9, e85869.
362. **Song R., Kafaie J., Yang L., Laughrea M.,** 2007. HIV-1 viral RNA is selected in the form of monomers that dimerize in a three-step protease-dependent process; the DIS of stem-loop 1 initiates viral RNA dimerization. **Journal of molecular biology** 371, 1084-1098.
363. **Starcich B.R., Hahn B.H., Shaw G.M., McNeely P.D., Modrow S., Wolf H., Parks E.S., Parks W.P., Josephs S.F., Gallo R.C., et al.,** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. **Cell** 45, 637-648.
364. **Steinmann E., Penin F., Kallis S., Patel A.H., Bartenschlager R., Pietschmann T.,** 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS pathogens** 3, e103.

365. **Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstiel G., Berg T., Weltman M., Abate M.L., Bassendine M., Spengler U., Dore G.J., Powell E., Riordan S., Sheridan D., Smedile A., Fragomeli V., Muller T., Bahlo M., Stewart G.J., Booth D.R., George J.**, 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nature genetics** 41, 1100-1104.
366. **Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T.**, 2007. Hepatitis C viral life cycle. **Advanced drug delivery reviews** 59, 1200-1212.
367. **Swanson P., de Mendoza C., Joshi Y., Golden A., Hodinka R.L., Soriano V., Devare S.G., Hackett J., Jr.**, 2005. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. **Journal of clinical microbiology** 43, 3860-3868.
368. **Swanson P., Huang S., Abravaya K., de Mendoza C., Soriano V., Devare S.G., Hackett J., Jr.**, 2007. Evaluation of performance across the dynamic range of the Abbott RealTime HIV-1 assay as compared to VERSANT HIV-1 RNA 3.0 and AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 using serial dilutions of 39 group M and O viruses. **Journal of virological methods** 141, 49-57.
369. **Swanstrom R., Wills J.W.**, 1997. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins, in: Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
370. **Syed G.H., Amako Y., Siddiqui A.**, 2010. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM** 21, 33-40.
371. **Tai C.L., Chi W.K., Chen D.S., Hwang L.H.**, 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). **Journal of virology** 70, 8477-8484.
372. **Takehisa J., Kraus M.H., Ayoub A., Bailes E., Van Heuverswyn F., Decker J.M., Li Y., Rudicell R.S., Learn G.H., Neel C., Ngole E.M., Shaw G.M., Peeters M., Sharp P.M., Hahn B.H.**, 2009. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. **Journal of virology** 83, 1635-1648.
373. **Tamalet C., Colson P., Tissot-Dupont H., Henry M., Tourres C., Tivoli N., Botta D., Ravaux I., Poizot-Martin I., Yahi N.**, 2003. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates: a survey of 535 strains circulating in southern France. **Journal of medical virology** 71, 391-398.

374. Tanaka Y., Agha S., Saady N., Kurbanov F., Orito E., Kato T., Abo-Zeid M., Khalaf M., Miyakawa Y., Mizokami M., 2004. Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt. **Journal of molecular evolution** 58, 191-195.
375. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Kurosaki M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M., 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature genetics** 41, 1105-1109.
376. Targett-Adams P., Hope G., Boulant S., McLauchlan J., 2008. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. **The Journal of biological chemistry** 283, 16850-16859.
377. Tellinghuisen T.L., Foss K.L., Treadaway J., 2008a. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. **PLoS pathogens** 4, e1000032.
378. Tellinghuisen T.L., Foss K.L., Treadaway J.C., Rice C.M., 2008b. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. **Journal of virology** 82, 1073-1083.
379. Tellinghuisen T.L., Marcotrigiano J., Gorbalenya A.E., Rice C.M., 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. **The Journal of biological chemistry** 279, 48576-48587.
380. Tellinghuisen T.L., Marcotrigiano J., Rice C.M., 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. **Nature** 435, 374-379.
381. Tellinghuisen T.L., Rice C.M., 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Current opinion in microbiology** 5, 419-427.
382. Thiam M., Diop-Ndiaye H., Diouf A.D., Vidal N., Ndiaye O., Ndiaye I., Ngom-Gueye N.F., Diallo S., Diongue O.D., Camara M., Seck A., Mboup S., Toure-Kane C., 2013. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. **Journal of clinical microbiology** 51, 578-584.
383. Timpe J.M., Stamataki Z., Jennings A., Hu K., Farquhar M.J., Harris H.J., Schwarz A., Desombere I., Roels G.L., Balfe P., McKeating J.A., 2008.

- Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 47, 17-24.
384. Toni T., Adje-Toure C., Vidal N., Minga A., Huet C., Borger M.Y., Recordon-Pinson P., Masquelier B., Nolan M., Nkengasong J., Fleury H.J., Delaporte E., Peeters M., 2005. Presence of CRF09_cpx and complex CRF02_AG/CRF09_cpx recombinant HIV type 1 strains in Cote d'Ivoire, West Africa. **AIDS research and human retroviruses** 21, 667-672.
385. Trapero-Marugan M., Moreno-Monteagudo J.A., Garcia-Buey L., Borque M.J., Medina J., Garcia-Sanchez A., Moreno-Otero R., 2007. Clinical and pathological characteristics and response to combination therapy of genotype 4 chronic hepatitis C patients: experience from a spanish center. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)** 19, 423-427.
386. Triques K., Bourgeois A., Vidal N., Mpoudi-Ngole E., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Torimiro N., Saman E., Delaporte E., Peeters M., 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. **AIDS research and human retroviruses** 16, 139-151.
387. Tristem M., Marshall C., Karpas A., Hill F., 1992. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. **The EMBO journal** 11, 3405-3412.
388. Troesch M., Meunier I., Lapierre P., Lapointe N., Alvarez F., Boucher M., Soudeyns H., 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. **Virology** 352, 357-367.
389. Turner B.G., Summers M.F., 1999. Structural biology of HIV. **Journal of molecular biology** 285, 1-32.
390. Vallari A., Bodelle P., Ngansop C., Makamche F., Ndembi N., Mbanya D., Kaptue L., Gurtler L.G., McArthur C.P., Devare S.G., Brennan C.A., 2010. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. **AIDS research and human retroviruses** 26, 109-115.
391. van Asten L., Verhaest I., Lamzira S., Hernandez-Aguado I., Zangerle R., Boufassa F., Rezza G., Broers B., Robertson J.R., Brettle R.P., McMenemy J., Prins M., Cochrane A., Simmonds P., Coutinho R.A., Bruisten S., 2004. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. **The Journal of infectious diseases** 189, 292-302.

392. **van den Berk G.E., Frissen P.H., Regez R.M., Rietra P.J.**, 2003. Evaluation of the rapid immunoassay determine HIV 1/2 for detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2. **Journal of clinical microbiology** 41, 3868-3869.
393. **van der Loeff M.F., Awasana A.A., Sarge-Njie R., van der Sande M., Jaye A., Sabally S., Corrah T., McConkey S.J., Whittle H.C.**, 2006. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. **International journal of epidemiology** 35, 1322-1328.
394. **Van Heuverswyn F., Li Y., Neel C., Bailes E., Keele B.F., Liu W., Loul S., Butel C., Liegeois F., Bienvenue Y., Ngolle E.M., Sharp P.M., Shaw G.M., Delaporte E., Hahn B.H., Peeters M.**, 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature** 444, 164.
395. **Varaklioti A., Vassilaki N., Georgopoulou U., Mavromara P.**, 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. **The Journal of biological chemistry** 277, 17713-17721.
396. **Vardabasso C., Manganaro L., Lusic M., Marcello A., Giacca M.**, 2008. The histone chaperone protein Nucleosome Assembly Protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. **Retrovirology** 5, 8.
397. **Verbeeck J., Stanley M.J., Shieh J., Celis L., Huyck E., Wollants E., Morimoto J., Farrior A., Sablon E., Jankowski-Hennig M., Schaper C., Johnson P., Van Ranst M., Van Brussel M.**, 2008. Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. **Journal of clinical microbiology** 46, 1901-1906.
398. **Vidal N., Diop H., Montavon C., Butel C., Bosch S., Ngole E.M., Toure-Kane C., Mboup S., Delaporte E., Peeters M.**, 2013. A novel multiregion hybridization assay reveals high frequency of dual inter-subtype infections among HIV-positive individuals in Cameroon, West Central Africa. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases** 14, 73-82.
399. **Voisset C., Callens N., Blanchard E., Op De Beeck A., Dubuisson J., Vu-Dac N.**, 2005. High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. **The Journal of biological chemistry** 280, 7793-7799.
400. **Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S., Alizon M.**, 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. **Cell** 40, 9-17.

401. **Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T.J.**, 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature medicine** 11, 791-796.
402. **Walewski J.L., Keller T.R., Stump D.D., Branch A.D.**, 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. **RNA (New York, N.Y.)** 7, 710-721.
403. **Wang Y., Song A., Xu S., Li X., Chong H., Zhao C., Nie J., Zhang C.**, 2008. Impact of HIV-1 genetic diversity in China on the measurement of viral load. **Journal of medical virology** 80, 1-8.
404. **Warrilow D., Meredith L., Davis A., Burrell C., Li P., Harrich D.**, 2008. Cell factors stimulate human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in vitro. **Journal of virology** 82, 1425-1437.
405. **Watashi K., Hijikata M., Hosaka M., Yamaji M., Shimotohno K.**, 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 38, 1282-1288.
406. **Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y., Shimotohno K.**, 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. **Molecular cell** 19, 111-122.
407. **Waters L., Mandalia S., Randell P., Wildfire A., Gazzard B., Moyle G.**, 2008. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America** 46, 1617-1623.
408. **Weeks K.M., Ampe C., Schultz S.C., Steitz T.A., Crothers D.M.**, 1990. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. **Science (New York, N.Y.)** 249, 1281-1285.
409. **Wills J.W., Craven R.C.**, 1991. Form, function, and use of retroviral gag proteins. **AIDS (London, England)** 5, 639-654.
410. **Wolf M., Dimitrova M., Baumert T.F., Schuster C.**, 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. **Nucleic acids research** 36, 3054-3064.
411. **Wolfe N.D., Prosser T.A., Carr J.K., Tamoufe U., Mpoudi-Ngole E., Torimiro J.N., LeBreton M., McCutchan F.E., Birx D.L., Burke D.S.**, 2004. Exposure to

- nonhuman primates in rural Cameroon. **Emerging infectious diseases** 10, 2094-2099.
412. **Wolk B., Sansonno D., Krausslich H.G., Dammacco F., Rice C.M., Blum H.E., Moradpour D.**, 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. **Journal of virology** 74, 2293-2304.
413. **Wooley D.P., Smith R.A., Czajak S., Desrosiers R.C.**, 1997. Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. **Journal of virology** 71, 9650-9653.
414. **Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hogerkorp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L., Longo N.S., McKee K., O'Dell S., Louder M.K., Wycuff D.L., Feng Y., Nason M., Doria-Rose N., Connors M., Kwong P.D., Roederer M., Wyatt R.T., Nabel G.J., Mascola J.R.**, 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. **Science (New York, N.Y.)** 329, 856-861.
415. **Xu H., Svarovskaia E.S., Barr R., Zhang Y., Khan M.A., Strebel K., Pathak V.K.**, 2004. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 101, 5652-5657.
416. **Xu Z., Choi J., Lu W., Ou J.H.**, 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. **Journal of virology** 77, 1578-1583.
417. **Yamaguchi J., Bodelle P., Vallari A.S., Coffey R., McArthur C.P., Schochetman G., Devare S.G., Brennan C.A.**, 2004. HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. **AIDS research and human retroviruses** 20, 944-957.
418. **Yang C., Dash B.C., Simon F., van der Groen G., Pieniazek D., Gao F., Hahn B.H., Lal R.B.**, 2000a. Detection of diverse variants of human immunodeficiency virus-1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses from chimpanzees by using generic pol and env primer pairs. **The Journal of infectious diseases** 181, 1791-1795.
419. **Yang C., Gao F., Funjungo P.N., Zekeng L., van der Groen G., Pieniazek D., Schable C., Lal R.B.**, 2000b. Phylogenetic analysis of protease and

- transmembrane region of HIV type 1 group O. **AIDS research and human retroviruses** 16, 1075-1081.
420. **Yang C., Pieniazek D., Owen S.M., Fridlund C., Nkengasong J., Mastro T.D., Rayfield M.A., Downing R., Biryawaho B., Tanuri A., Zekeng L., van der Groen G., Gao F., Lal R.B.**, 1999. Detection of phylogenetically diverse human immunodeficiency virus type 1 groups M and O from plasma by using highly sensitive and specific generic primers. **Journal of clinical microbiology** 37, 2581-2586.
421. **Yi M., Ma Y., Yates J., Lemon S.M.**, 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. **Journal of virology** 81, 629-638.
422. **You S., Stump D.D., Branch A.D., Rice C.M.**, 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. **Journal of virology** 78, 1352-1366.
423. **Yu X.F., Dawson L., Tian C.J., Flexner C., Dettenhofer M.**, 1998. Mutations of the human immunodeficiency virus type 1 p6Gag domain result in reduced retention of Pol proteins during virus assembly. **Journal of virology** 72, 3412-3417.
424. **Zein N.N.**, 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clinical microbiology reviews** 13, 223-235.
425. **Zeisel M.B., Koutsoudakis G., Schnober E.K., Haberstroh A., Blum H.E., Cosset F.L., Wakita T., Jaeck D., Dofoel M., Royer C., Soulier E., Schvoerer E., Schuster C., Stoll-Keller F., Bartenschlager R., Pietschmann T., Barth H., Baumert T.F.**, 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. **Hepatology (Baltimore, Md.)** 46, 1722-1731.
426. **Zeuzem S., Hultcrantz R., Bourliere M., Goeser T., Marcellin P., Sanchez-Tapias J., Sarrazin C., Harvey J., Brass C., Albrecht J.**, 2004. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. **Journal of hepatology** 40, 993-999.
427. **Zhang H., Dornadula G., Orenstein J., Pomerantz R.J.**, 2000. Morphologic changes in human immunodeficiency virus type 1 virions secondary to intravirion reverse transcription: evidence indicating that reverse transcription may not take place within the intact viral core. **Journal of human virology** 3, 165-172.

428. **Zheng A., Yuan F., Li Y., Zhu F., Hou P., Li J., Song X., Ding M., Deng H., 2007.** Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. **Journal of virology** 81, 12465-12471.
429. **Zheng R., Jenkins T.M., Craigie R., 1996.** Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93, 13659-13664.
430. **Zhou Q., Sharp P.A., 1995.** Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. **The EMBO journal** 14, 321-328.
431. **Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.Y., Dai K., Finzi A., Kwon Y.D., Scheid J.F., Shi W., Xu L., Yang Y., Zhu J., Nussenzweig M.C., Sodroski J., Shapiro L., Nabel G.J., Mascola J.R., Kwong P.D., 2010.** Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. **Science (New York, N.Y.)** 329, 811-817.

Références bibliographiques

Annexes



High frequency of HIV-1 infections with multiple HIV-1 strains in men having sex with men (MSM) in Senegal



Nafissatou Leye^{a,b}, Nicole Vidal^{b,*}, Ousseynou Ndiaye^a, Halimatou Diop-Ndiaye^a, Abdoulaye Sidibé Wade^c, Souleymane Mboup^a, Eric Delaporte^{b,d}, Coumba Toure-Kane^a, Martine Peeters^b

^a Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Le Dantec, Dakar, Senegal

^b UMI 233, TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), University of Montpellier 1 (UMI), Montpellier, France

^c Division de lutte contre le SIDA/IST, Dakar, Senegal

^d Département des Maladies Infectieuses, CHU, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2013

Received in revised form 28 August 2013

Accepted 2 September 2013

Available online 11 September 2013

Keywords:

HIV-1

Subtype

Recombinant

Dual infections

MSM

Senegal

ABSTRACT

Circulating and unique recombinant HIV-1 strains continue to be identified and their number increases over time, suggesting that co-infection with multiple HIV-1 is frequent. In this study we analyzed to what extent dual infections with different HIV-1 variants occur in a population group with high risk behaviour, high HIV-1 prevalence and in an area where multiple HIV-1 subtypes and Circulating Recombinant Forms (CRFs) co-circulate. We studied 69 MSM with our recently developed multi-region hybridization assay (MHA), based on fluorescent probe detection for eight common variants circulating in West and West Central Africa. At least 11 (15.9%) of the 69 patients were simultaneously infected with two different HIV-1 subtypes and/or CRFs. Among the 29 samples identified as subtype C by MHA in gag, 15 (57.7%) reacted with both C1 and C2 probes. Sequence analysis suggests that the majority of the samples reactive with C1 and C2 probes are most likely infected with two different subtype C clades. Single genome amplification and DNA dilutions confirmed dual infection with subtype D and C for MSM1193, triple infection with two different C subtype strains and one CRF02_AG strain in MSM1157 and showed that MSM3017 is at least co-infected with CRF06_cpx and CRF02_AG and another strain that could not be classified. Comparison of all subtype C sequences from the MSM population and from the general population from this and previous studies confirmed the intermixing of HIV-1 variants between low-risk women and high-risk men as shown by the intermixing of subtype C variants from MSM1157 and a female patient (02SN-HALD478). Comparison of dual infection rates between the general population and MSM in Senegal, show also clearly the importance of high HIV prevalence and high risk behavior in dual infections and subsequent intermixing of HIV-1 variants which can lead to emergence and spread of new recombinants (CRFs).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

HIV is characterized by a considerable genetic diversity, resulting from the high viral turn-over, the high mutation rate and the recombinogenic characteristics of the reverse transcriptase enzyme, together with immune and therapeutic selection pressures. The pandemic HIV-1 group M strains are subdivided into subtypes (A–D, F–H, J and K), sub-subtypes (A1–A4, F1–F2), and numerous circulating recombinant forms (CRF) (<http://hiv-web.lanl.gov/CRFs/CRFs.html>). Actually, new recombinant strains, CRFs and

URFs (unique recombinant forms) continue to be identified and their number increases over time in the global epidemic and especially in certain geographic areas (Hemelaar et al., 2011; Zhang et al., 2010). Recombinant viruses are the result of dual (co- or super) infections with different HIV-1 variants (van der Kuyt and Cornelissen, 2007; Pernaas et al., 2006; Monoz-Nieto et al., 2008). The fact that numerous recombinant viruses have been discovered clearly implies that co-infection with divergent HIV-1 strains is more frequent than previously thought. High HIV-1 genetic diversity, populations with high risk behavior and high HIV prevalence are the main determinants of the frequency of dual infections with different subtypes/CRFs. Depending on the population groups studied (high versus low risk), the regional HIV-1 prevalence and the different methodologies used, rates of dual infection between 0% and 20% have been reported in African countries (Herbinger

* Corresponding author. Address: UMI 233, IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 04 67 41 62 58; fax: +33 04 67 41 61 46.

E-mail address: nicole.vidal@ird.fr (N. Vidal).

et al., 2006; Ssemwanga et al., 2012; Hoelscher et al., 2002; Vidal et al., 2013). Dual infections can also be associated with faster disease progression in case of superinfection, or acquisition of drug resistant strains (Cornelissen et al., 2012; Gottlieb et al., 2004; Smith et al., 2005). Finally, the high rates of superinfection constitute an additional obstacle for development of an efficient vaccine (Chohan et al., 2010).

Senegal is a country characterized by a low and stable HIV prevalence in the general population (0.7%), suggesting that the HIV epidemic has stabilized. However, similarly to other countries in the world, HIV prevalence is high (around 20%) in key populations such as MSM (men having sex with men) and PSW (female sex workers) (www.unaids.org; Wade et al., 2010). Epidemiological studies in Senegal revealed the high vulnerability of MSM to HIV infection and other sexually transmitted diseases, and showed evidence for behavioral links between MSM and heterosexual networks, due to massive stigma and criminalization of homosexuality (Poteat et al., 2011). A high number (>80%) of MSM in Senegal reported having sex with female partners, as in other studies on MSM, and could serve as a bridge for intermixing of HIV-1 variants between low-risk women and high-risk men (Lamarange et al., 2009; Baral et al., 2007; Solomon et al., 2010). Genetic characterization of HIV-1 strains in Senegal showed that CRF02_AG was the most common genetic form in the general population, together with numerous other subtypes/CRFs that co-circulate (Touré-Kane et al., 2010; Diop-Ndiaye et al., 2010). In contrast, subtype C (40–50%) predominates in the MSM population, followed by CRF02_AG and subtype B, as shown in two consecutive surveys in 2004 and 2007 (Diop-Ndiaye et al., 2009; Ndiaye et al., 2013). Evolutionary reconstructions suggest that multiple subtype C viruses entered Senegal but only one, which most likely resulted from a single introduction, did efficiently spread in the MSM population underlining the importance of high risk behavior in the efficient spread of viruses (Jung et al., 2012).

Taking into account the high HIV prevalence in MSM and their high risk behavior as shown by the presence of multiple transmission clusters (Diop-Ndiaye et al., 2009; Ndiaye et al., 2013) we studied the prevalence of dual infections in the MSM population in Senegal with our recently developed multi-region hybridization assay (MHA), based on fluorescent probe detection for eight common variants circulating in West and West Central Africa (Vidal et al., 2013). We showed high rates of dual infection, not only with heterosexual subtypes/CRFs but also with strains from the same subtype.

2. Materials and methods

2.1. Study populations

We studied blood samples from 69 HIV-1 positive MSM who participated in the national epidemiological and behavioral survey (ELIHos) that was conducted in 2007 in Senegal, and for which HIV-1 subtypes and CRFs have been recently reported in gag (p24), pol (protease and RT) and env (V3–V5 region) (Ndiaye et al., 2013). MSM were recruited by snowball sampling method using peer leaders in three sites: the capital city Dakar ($n = 56$), St. Louis ($n = 3$), and Mbour/Thies ($n = 10$), as previously described (Lamarange et al., 2010).

2.2. Multiregion hybridization assay (MHA)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) DNA was extracted using QIAamp viral DNA kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) as indicated by the manufacturer. MHA was conducted as recently published in two genomic regions: gag (p17) and vpu (Vidal et al.,

2013). First PCR amplification rounds were performed in classical format on 5 μ l DNA by using outer primers MHVPU1-MHVPU2 and G00-G25 for vpu and gag, respectively. The second round PCR reactions were performed in a TaqMan real-time format, in a 96-well spectrofluorometric ABI7000 sequence detection system (Applied Biosystems, France), by using inner primers MHVPU3-MHVPU4 and MHGAG5-MHGAG6 for vpu and gag, respectively. Probes designed to hybridize with eight common HIV-1 variants from West and West-Central Africa were used in separate real-time PCR reactions. Fluorescence intensity was monitored at the end of each cycle, and samples were considered positive when the fluorescence intensity was increasing exponentially during the real-time PCR. All samples hybridizing with more than one probe per subtype/CRF or with probes from different subtypes and CRFs were repeated. The MHA assay was developed to identify subtypes A, B/D, C, F, G, CRF02_AG, CRF06_cpx and CRF22_01A1.

2.3. Sequencing and phylogenetic analysis

The HIV-1 subtype/CRF designations in the corresponding genomic regions were also done by direct sequencing of the second round PCR products using the inner primers MHVPU3 and MHVPU4 for the vpu region. In the gag p17 region, a larger fragment embedding the hybridization region was amplified and sequenced using primers MHGAG1 and MHGAG4, as previously published (Vidal et al., 2013). Sequencing was done by using the BigDye Terminator kit version 3.1, and electrophoresis was run on the 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, France). Electrophoregrams were assembled with SeqMan II from the DNA-Star package version 5.08 (Lasergene, Madison, USA). Sequences were aligned under Muscle with HIV-1 reference sequences using Seaview software v4.3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>). Alignments were end-trimmed then degapped by using G-Blocks software (http://molevo.cnima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). Phylogenetic analysis used maximum likelihood method under PhyML v3.0 and aRT SH-like branch supports (Guindon et al., 2009; Anisimova and Gascael, 2006).

2.4. Single genome amplification (SGA) and DNA diluting

In order to confirm dual infection, single genome amplification (SGA) was performed as previously reported in the gag p17 and vpu regions for a limited number of samples that displayed responses to multiple probes in the MHA assay (Salazar-Gonzalez et al., 2008). Experiments were done for each sample separately. Plasma viral loads were first measured using the commercial viral load assay Nuclisens EasyQ version 2.0 (Biomerieux, Lyon, France). For SGA, viral RNA was extracted using QIAamp viral RNA kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), and was reverse transcribed by using the outer antisense primers MHVPU2 and G25 for vpu and gag, respectively (Expand RT, Roche Diagnostics, Meylan, France). According to the plasma viral load measurements, dilutions of complementary DNA were made and subsequently submitted to nested PCR in 16-well PCR plates to identify the dilution giving no more than 30% positive wells. The cDNA dilution yielding less than 30% of positive PCR results was used to generate vpu and gag PCR products in 96-well plate format. Positive PCR products were sequenced as described above. Chromatograms were carefully inspected to further discard those exhibiting mixed populations. On one sample for which plasma was not available, DNA dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) were made that were separately submitted to nested PCR in 16-well PCR plates, from which positive products were sequenced. The MHA assay was further performed on the first round PCR products obtained for SGA, by using the probes that hybridized initially on the non-diluted DNA template.

2.5. Accession numbers

Sequences in gag (p17) and vpu have been submitted to EMBL database for the MSM population group, under accession numbers HG327169–HG327222 and HG327223–HG327293, respectively.

3. Results

3.1. Dual infection with different subtypes and/or CRFs

The MHA assay was applied in gag p17 and vpu on 69 samples from MSM to identify the HIV-1 subtypes, CRFs and dual infections (Table 1a). Among the 69 samples, 47 (68.1%) were reactive with probes in gag and vpu, 12 (17.4%) reacted only with probes in vpu, 8 (11.6%) reacted only with probes in gag and 2 (2.9%) did not react at all. Overall, 55/69 (79.7%) samples were reactive in gag, and 59/69 (85.5%) in vpu. The two samples that were negative in MHA were characterized as CRF09_cpx or as a C/CRF09_cpx recombinant by the corresponding sequences in gag and vpu. The 12 samples reacting only with vpu probes were identified as CRF02_AG (n = 3), subtype B/D (n = 2), C (n = 6) and G (n = 1), and the eight samples reacting only with gag probes were CRF02_AG (n = 3), subtype C (n = 2), G (n = 1) and two were simultaneously reactive with multiple probes (gag22+gagA and gag22+gagA+gagB/D). The subtype distribution and rates of dual infections were calculated among the 47 samples for which we obtained probe reactivity in the two genomic regions. Overall, 9 (19.1%) were CRF02_AG, 1 (2.1%) was B/D, 22 were subtype C (46.8%), 4 (8.5%) were URF, and 11 (23.4%) were considered as dually infected because they reacted simultaneously with probes from different subtypes or CRFs. For the 11 samples that were considered as dually reactive by MHA, we sequenced the corresponding genomic fragments and verified probe and sample sequences. Dual infections involved subtypes A, C, B/D, G, CRF02_AG, and CRF22_01A1. For nine samples (1193, 1187, 1240, 1047, 1157, 2005, 1120, 1209, 1045), four to eight mismatches were present between the heterologous probes and the bulk sequences, indicating that hybridization was not possible anymore and confirming thus that these nine samples most likely correspond to dual infections (Table 1b). For the remaining two samples that reacted with the 22+A or with B/D+A probes in gag, one to three mismatches were observed and cross-reactivity cannot be excluded.

Among the 47 samples, four were identified as URF and the following subtypes or CRFs were involved: CRF02_AG, A, F and G in gag, and CRF02_AG and B/D in vpu. The corresponding genomic fragments were sequenced for the four URFs. The results are summarized in Table 1b and show that for three samples the subtype/CRF designation was different between MHA and the sequence in gag. Comparison of the probe sequences and sequences of the samples revealed that for two samples (2016, 3017) the number of mismatches with the heterologous probe was between 10 and 11, which is too high to allow any hybridisation, therefore these samples could also represent dual infections.

3.2. Dual infection with multiple subtype C strains

In our previous study reporting on the validation of the new MHA assay, we showed that we needed a combination of several probes in gag to increase the sensitivity to detect subtype C strains (Vidal et al., 2013). We used two probes named gagC1 and gagC1 bis specific for east African and Brazilian subtype C strains, and one probe, referred to as gagC2, that is better adapted to detect subtype C strains from other geographic regions (southern Africa, India)

Table 1a

Subtype/CRF designations on 69 HIV-1 positive samples from MSM in Senegal, identified by the multi-hybridization assay in gag p17 and vpu regions with probes designed to detect subtypes A, B/D, C, F, G, CRF02_AG, CRF09_cpx and CRF22_01A1. [–] means no probe reactivity.

Sample id	Subtype/CRF MHA gag p17	Subtype/CRF MHA vpu	Remarks
MSM1179	–	–	
MSM1048	–	–	
MSM1118	–	CRF02	
MSM1295	–	CRF02	
MSM1305	–	CRF02	
MSM1221	–	B/D	
MSM4017	–	B/D	
MSM1212	–	C	
MSM1075	–	C	
MSM1178	–	C	
MSM1259	–	C	
MSM1060	–	C	
MSM1174	–	C	
MSM013	–	G	
MSM1083	CRF02	–	
MSM1292	CRF02	–	
MSM022	CRF02	–	
MSM007	C	–	
MSM189	C	–	
MSM106	G	–	
MSM1268	CRF22+A	–	Dual infection
MSM1046	B/D+A/CRF22	–	Dual infection
MSM1068	CRF02	CRF02	
MSM1289	CRF02	CRF02	
MSM4077	CRF02	CRF02	
MSM1229	CRF02	CRF02	
MSM151	CRF02	CRF02	
MSM165	CRF02	CRF02	
MSM4040	CRF02	CRF02	
MSM1215	CRF02	CRF02	
MSM084	CRF02	CRF02	
MSM1078	B/D	B/B	
MSM125	C	C	
MSM100	C	C	
MSM021	C	C	
MSM107	C	C	
MSM185	C	C	
MSM1043	C	C	
MSM1092	C	C	
MSM1177	C	C	
MSM189	C	C	
MSM196	C	C	
MSM1065	C	C	
MSM1085	C	C	
MSM1257	C	C	
MSM1246	C	C	
MSM1293	C	C	
MSM1147	C	C	
MSM1072	C	C	
MSM1088	C	C	
MSM184	C	C	
MSM012	C	C	
MSM034	C	C	
MSM1203	C	C	
MSM016	CRF02	B/D	URF
MSM1005	A	B/D	URF
MSM1017	F	CRF02	URF
MSM1122	G	CRF02	URF
MSM015	CRF22+A	CRF02	Dual infection
MSM1045	CRF22+A	C	Dual infection
MSM1240	C	C-B/D	Dual infection
MSM1047	CRF02+C	CRF02+C	Dual infection
MSM1120	CRF02	CRF02+C	Dual infection
MSM005	CRF02-B/D	CRF02	Dual infection
MSM157	CRF02+C	CRF02+C	Dual infection
MSM1209	A+G	CRF02	Dual infection
MSM1115	B/D+A	B/D	Dual infection
MSM193	C	C-B/D	Dual infection
MSM187	C	C-B/D	Dual infection

Table 1b

Comparison of subtype/CRF designations on samples identified as dually infected or as URF by MHA (see Table 1a) with subtype/CRFs designations identified by sequence and phylogenetic tree analysis. The number of mismatches between sample sequence and heterologous probes are shown (* numbers indicate number of mismatches, letters refer to the subtype/CRF of the heterologous probe). nt, not treated.

Sample id	Subtype/CRF gag p17		Mismatches		Subtype/CRF vpr		Mismatches	Remarks
	MHA	Sequence	With heterologous probes in gag*	MHA	Sequence	With heterologous probes in vpr		
MSM1288	CRF22+A	CRF01	1 CRF01, 1 A	-	CRF02			Non-specific cross-reactivity
MSM1046	B/J	B	3 CRF22, 3 A	-	B			Non-specific cross-reactivity?
	D+A+CRF22							
MSM2015	CRF22+A	CRF01 1	CRF01, 1 A	CRF02	CRF02			Non-specific cross-reactivity
MSM1045	CRF22+A	C	6 CRF22, 7 A	C	C			Dual infection
MSM1240	C	C		C/B/D	C	6 B/D		Dual infection
MSM1047	CRF02+C	CRF02	4-5 C	CRF02+C	CRF02	7 C		Dual infection
MSM1120	CRF02	CRF02		CRF02+C	C	8 CRF02		Dual infection
MSM2005	CRF02+B/D	CRF02	5 B/D	CRF02	CRF02			Dual infection
MSM1157	CRF02+C	nt		CRF02+C	CRF02	7 C		Dual infection
MSM1209	A+G	G	6 A	CRF02	CRF02			Dual infection
MSM1115	B/D+A	B	3 A	B/D	B			Non-specific cross-reactivity?
MSM1193	C	C		C/B/D	D	7 C		Dual infection
MSM1187	C	nt		C/B/D	C	7 B/D		Dual infection
MSM2016	CRF02	B	10 CRF02	B/D	B			Dual infection
MSM1005	A	B	2 A	B/D	B			Non-specific cross-reactivity?
MSM3017	F	G	11 F, 5 G	CRF02	CRF02			Dual infection
MSM1122	G	G		CRF02	CRF02			URF

Table 2

Details of reactivity with C1 and C2 probes in gag. Comparison of subtype C sequence from the samples with the sequence of C1 and C2 gag probes to identify number of mismatches. nt, not treated.

Sample id	MHA gag p17		gag p17		Remarks
	Reactivity with subtype C probes	Sequence	Mismatches C1 probe	Mismatches C2 probe	
MSM1225	C1	C	5	4	Dual C?
MSM1100	C1	nt	nt	nt	
MSM1021	C1	nt	nt	nt	
MSM1037	C1	C	5	4	Dual C?
MSM1185	C1	nt	nt	nt	
MSM1072	C2	C	7	1	Single C infection
MSM1088	C2	C	7	1	Single C infection
MSM1184	C2	C	7	1	Single C infection
MSM3012	C2	C	6	2	Single C infection
MSM2034	C2	C	8	2	Single C infection
MSM1203	C2	nt	nt	nt	
MSM1187	C2	nt	nt	nt	
MSM1240	C2	C	6	1	Single C infection
MSM3007	C2	CRF02	nt	nt	Dual C + CRF02 infection
MSM1189	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1043	C1+C2	C	5	2	Dual C infection
MSM1092	C1+C2	nt	nt	nt	
MSM1177	C1+C2	C	6	2	Dual C infection
MSM1189	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1196	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1065	C1+C2	C	5	3	Dual C infection
MSM1095	C1+C2	C	7	2	Dual C infection
MSM1257	C1+C2	nt	nt	nt	
MSM1246	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1293	C1+C2	C	5	2	Dual C infection
MSM1147	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1193	C1+C2	C	6	2	Dual C infection
MSM1047	C1+C2+02	CRF02	5	4	Dual C? + CRF02
MSM1157	C1+C2+02	nt	nt	nt	

(Jung et al., 2012; Delatorre and Bello, 2012). In our study, 29 samples were identified as subtype C by MHA in gag (Table 2). Among these 29 subtype C samples, five reacted only with C1 probes, nine only with the C2 probe and 15/29 (51.7%) reacted with both C1 and C2 probes. Sequences of the corresponding fragments were obtained for 11 of the 15 dual reactive samples and we compared probe sequences for mismatches to examine whether this dual reactivity represents dual infection with different subtype C clades or cross-reactivity. For 10 of the 11 dual samples for which corre-

sponding subtype C sequences were available, only one or two mismatches were seen with the C2 probe, versus five to seven with the C1 probe. A single sample showed three mismatches with the C2 probe versus five with C1. These observations suggest that the majority of the samples reactive with C1 and C2 probes are most likely infected with two different subtype C clades. The phylogenetic tree of the gag p17 sequences shows that all clustered in the same subtype C clade with reference strains from southern Africa (Fig. 1). We compared also the sequences of probes with se-

Table 1b

Comparison of subtype/CRF designations on samples identified as dually infected or as URF by MHA (see Table 1a) with subtype/CRFs designations identified by sequence and phylogenetic tree analysis. The number of mismatches between sample sequence and heterologous probes are shown (*numbers indicate number of mismatches, letters refer to the subtype/CRF of the heterologous probe). nt, not treated.

Sample id	Subtype/CRF gag p17			Subtype/CRF vif			Remarks
	MHA	Sequence	With heterologous probes in gag*	MHA	Sequence	With heterologous probes in vif	
MSM1268	CRF22+A	CRF01	1 CRF01, 1 A	-	CRF09		Non-specific cross-reactivity
MSM1046	B/ D+A+CRF22	B	3 CRF22, 3 A	-	B		Non-specific cross-reactivity?
MSM2015	CRF22+A	CRF01.1	CRF01, 1 A	CRF02	CRF02		Non-specific cross-reactivity
MSM1045	CRF22+A	C	6 CRF22, 7 A	C	C		Dual infection
MSM1240	C	C		C/B/D	C	6 B/D	Dual infection
MSM1047	CRF02+C	CRF02	4–5 C	CRF02+C	CRF02	7 C	Dual infection
MSM1120	CRF02	CRF02		CRF02+C	C	8 CRF02	Dual infection
MSM2005	CRF02+B/D	CRF02	5 B/D	CRF02	CRF02		Dual infection
MSM1157	CRF02+C	nt		CRF02+C	CRF02	7 C	Dual infection
MSM1200	A+G	G	6 A	CRF02	CRF02		Dual infection
MSM1115	B/D+A	B	3 A	B/D	B		Non-specific cross-reactivity?
MSM1193	C	C		C/B/D	D	7 C	Dual infection
MSM1187	C	nt		C/B/D	C	7 B/D	Dual infection
MSM2016	CRF02		10 CRF02	B/D	B		Dual infection
MSM1005	A	B	2 A	B/D	B		Non-specific cross-reactivity?
MSM3017	F	G	11 F, 5 G	CRF02	CRF02		Dual infection
MSM1122	G	G		CRF02	CRF02		URF

Table 2

Details of reactivity with C1 and C2 probes in gag. Comparison of subtype C sequence from the samples with the sequence of C1 and C2 gag probes to identify number of mismatches. nt, not treated.

Sample id	MHA gag p17		gag p17		Remarks
	Reactivity with subtype C probes	Sequence	Mismatches C1 probe	Mismatches C2 probe	
MSM1225	C1	C	5	4	Dual C?
MSM1100	C1	nt	nt	nt	
MSM1021	C1	nt	nt	nt	
MSM1037	C1	C	5	4	Dual C?
MSM1185	C1	nt	nt	nt	
MSM1072	C2	C	7	1	Single C infection
MSM1088	C2	C	7	1	Single C infection
MSM1194	C2	C	7	1	Single C infection
MSM3012	C2	C	6	2	Single C infection
MSM2034	C2	C	8	2	Single C infection
MSM1203	C2	nt	nt	nt	
MSM1187	C2	nt	nt	nt	
MSM1240	C2	C	6	1	Single C infection
MSM3007	C2	CRF02	nt	nt	Dual C+CRF02 infection
MSM1160	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1043	C1+C2	C	5	2	Dual C infection
MSM1092	C1+C2	nt	nt	nt	
MSM1177	C1+C2	C	6	2	Dual C infection
MSM1180	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1196	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1065	C1+C2	C	5	3	Dual C infection
MSM1095	C1+C2	C	7	2	Dual C infection
MSM1257	C1+C2	nt	nt	nt	
MSM1246	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1293	C1+C2	C	5	2	Dual C infection
MSM1147	C1+C2	C	6	1	Dual C infection
MSM1193	C1+C2	C	6	2	Dual C infection
MSM1047	C1+C2+02	CRF02	5	4	Dual C? + CRF02
MSM1157	C1+C2+02	nt	nt	nt	

(Jung et al., 2012; Delatorre and Bello, 2012). In our study, 29 samples were identified as subtype C by MHA in gag (Table 2). Among these 29 subtype C samples, five reacted only with C1 probes, nine only with the C2 probe and 15/29 (51.7%) reacted with both C1 and C2 probes. Sequences of the corresponding fragments were obtained for 11 of the 15 dual reactive samples and we compared probe sequences for mismatches to examine whether this dual reactivity represents dual infection with different subtype C clades or cross-reactivity. For 10 of the 11 dual samples for which corre-

sponding subtype C sequences were available, only one or two mismatches were seen with the C2 probe, versus five to seven with the C1 probe. A single sample showed three mismatches with the C2 probe versus five with C1. These observations suggest that the majority of the samples reactive with C1 and C2 probes are most likely infected with two different subtype C clades. The phylogenetic tree of the gag p17 sequences shows that all clustered in the same subtype C clade with reference strains from southern Africa (Fig. 1). We compared also the sequences of probes with se-

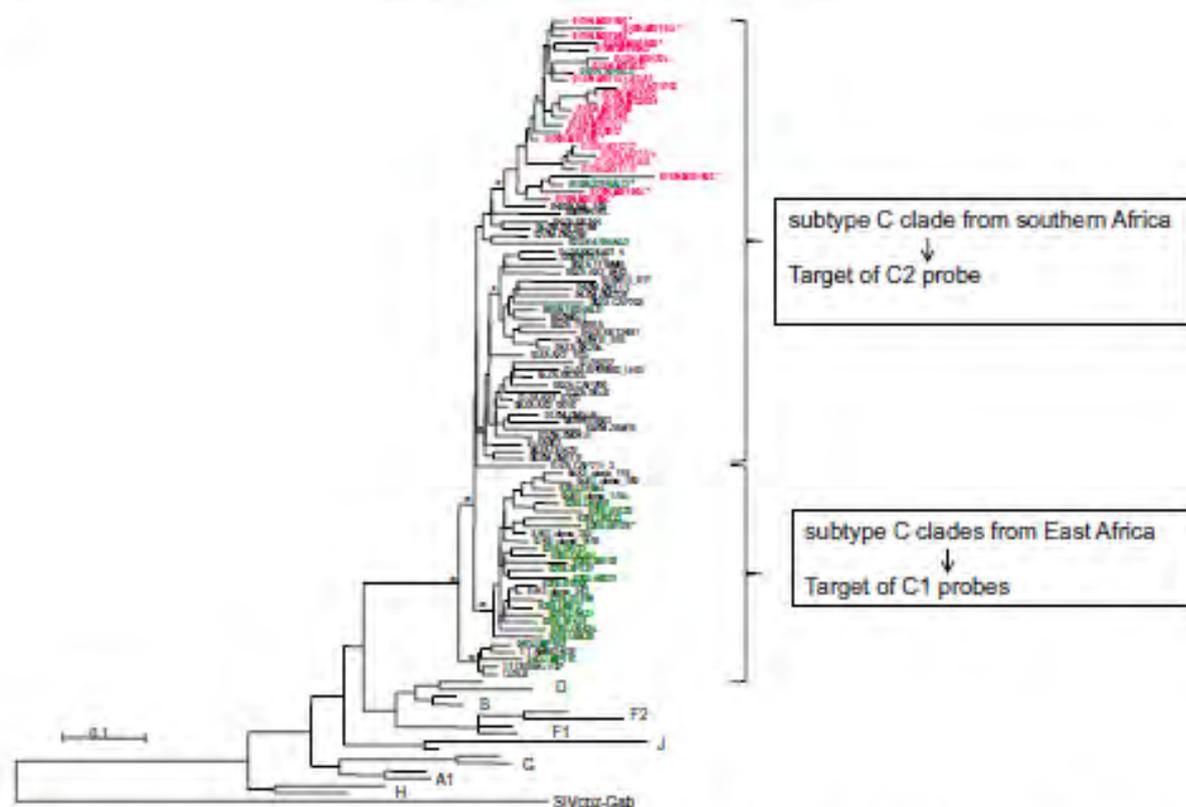


Fig. 1. Phylogenetic tree illustrating the two subtype C clades in the gag p7 region (234 bp) for which the C1 and C2 probes were designed. The strains highlighted in pink correspond to samples from MSM analyzed in this study, strains highlighted in green are from samples reported in our previous study on the development of the MHA assay (Vidal et al., 2011), in black are reference sequences from Genbank. Strains that were simultaneously reactive with gagC1 and gagC2 probes are indicated in bold and with an asterisk, strains reactive with gagC1 probe only are in bold and italic, those reactive with gagC2 only are in bold only, finally samples that did not react with any subtype C probes are in italic only. The reference strains in black were not used in the MHA assay in this and our previous study. Branch support values (aLRT, SH-like, (Anisimov and Gascuel, 2006)) above 0.80 were indicated with asterisk on the tree branches. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

quences obtained from samples reacting only with C2 or C1 probes. Seven of the nine samples reacting only with the C2 probe were sequenced; six were subtype C falling in the clade with references from southern Africa, and only one to two mismatches with the C2 probe were observed versus six to eight with the C1 probe, and one sample (3007) was CRF02_AG by sequence analysis, indicating an additional dual infection. From the five samples reacting only with C1 probes, sequences were obtained for two samples and showed five mismatches with gagC1 and four with gagC2, suggesting that the sample could also be dually infected with one strain that hybridizes with the C1 probe, and with another strain from which we obtained the sequence and which most likely does not hybridize with the probes of the assay. In the phylogenetic tree they cluster also with the southern African references (Fig. 1).

3.3. Confirmation of dual infections by single genome amplification (SGA) and DNA dilutions

3.3.1. Dual infection with HIV-1 subtypes D and C

In the *vpu* gene, MSM1193 was classified as subtype D by sequence analysis but the sample hybridized in *vpu* with both B/D and C probes. Plasma was not available and therefore the DNA was diluted as indicated in Materials and methods. Only two se-

quences were obtained, each at a different dilution, and confirmed the existence of two different viruses, one subtype D and one subtype C, in the *vpu* gene (Fig. 2). Moreover each PCR product hybridized with the homologous probe and did not hybridize with the heterologous one. In the gag p17 region, the MSM1193 sample hybridized also with C1 and C2 probes with six and two mismatches, respectively, but there was not sufficient DNA available to confirm a possible dual infection with different subtype C clades.

3.3.2. Co-infection with multiple HIV-1 variants including CRF02_AG and CRF06_cpx

MHA identified sample 3017 as subtype F in gag and CRF02_AG in *vpu*. But sequence analysis revealed subtype G in gag and confirmed CRF02_AG in *vpu*. A total of 11 mismatches between the sample sequence and the gagF probe were observed and suggested thus a dual infection. Plasma viral load of the sample was 6400 copies/ml and single genome amplification was attempted. In gag, 26 sequences from unique molecules were obtained, all forming a separate cluster that did not clearly fall within any of the known subtypes or CRFs, and no hybridization was observed with F or G probes in gag due to high number of mismatches (11 and 5 with F and G probes, respectively). In *vpu*, 11 sequences from single molecules formed a cluster of closely related strains falling in the CRF06_cpx lineage (Fig. 3). The MHA assay yielded only positive

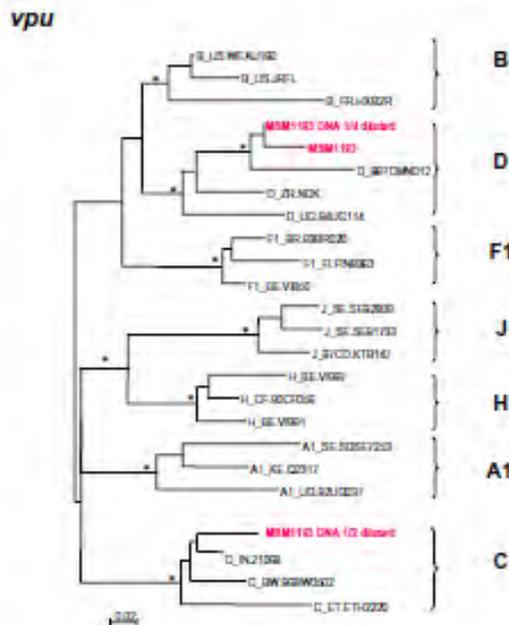


Fig. 2. Confirmation of dual infection with HIV-1 subtypes C and D. Phylogenetic tree analysis in the *vpu* gene (229 bp) of sequences obtained from patient MSM1157 obtained by direct sequencing of undiluted and diluted proviral DNA. The sequences from the patient are highlighted in pink. Branch support values (aLRT, SH-Boot, [Anisimova et al. 2008], 2008) above 0.80 were indicated with asterisk on the inner branches. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

results with the CRP06 probe, and negative responses with the CRP02 probes in contrast to the bulk sequence. Moreover, independent PCR and sequence analysis on proviral DNA in Dakar characterized the sample as CRP06_cpx in *vpu* and as A3/CRP02_AG in the p24 gag regions (Ndiaye et al., 2013). These results show that this patient is at least co-infected with CRP06_cpx and CRP02_AG and possibly also with a subtype F and/or subtype G and/or untypable strain.

3.3.3. Co-infection with two subtype C strains and CRP02_AG

Sample MSM1157 was only sequenced in *vpu* and was identified as CRP02_AG but hybridized with both C and CRP02_AG probes in *vpu* and with C1, C2 and CRP02_AG probes in gag, indicating at least a dual infection with CRP02_AG and subtype C in both genes. Plasma viral load was 440,000 copies/ml and SGA was attempted to confirm dual infection in gag and *vpu*. In gag p17, nine unique molecules were obtained; six were subtype C and three were CRP02_AG by sequence analysis, and each molecule hybridized only with homologous probes, but for subtype C no hybridization occurred with the C1 probe in gag. In the *vpu* gene, ten unique molecules were obtained: one was CRP02_AG by sequence analysis, closely related to the sequence derived from the initial bulk PCR product and nine were identified as subtype C, falling into two different subclusters in the phylogenetic tree (Fig. 4). The first cluster contained seven sequences and the second cluster contained two sequences. The genetic distance between the two C subclades was 8.12%. In the MHA assay, the unique molecules hybridized only with homologous probes, i.e., subtype C with C probe and

CRP02_AG with CRP02_AG probe. Therefore SGA confirmed unambiguously the triple infection with two different C subtype strains and CRP02_AG.

3.4. Evidence for exchange of HIV-1 strains between MSM and female HIV-1 infected patients in Senegal

We previously showed that in Senegal two subtype C clades co-circulate, i.e., the east-African/Brazilian clade and southern African clade, with only the southern African clade in the MSM population (Jung et al., 2012). Given the high number of MSM in this study that are potentially infected with subtype C strains from both clades, we compared all subtype C sequences from MSM from this and previous studies with subtype C sequences from the general population (Touré-Kane et al., 2000; Diop-Ndiaye et al., 2010). This analysis showed that in *vpu*, one of the subtype C variants from patient MSM1157 was closely related to the bulk *vpu* sequence from sample 478HALD (accession AM942266) sequenced four years before and obtained from a woman that was sampled five years before the MSM patient. Subsequently and independently from the above described MHA, sequence and SGA analyses for the MSM patient (i.e., different dates and manipulators), single genome amplification was therefore performed on the available plasma sample (80,200 copies/ml) from this female patient. In the gag gene, 15 sequences derived from unique molecules of subtype C clustered together, but were not phylogenetically related to the subtype C sequences from the MSM patient (Fig. 4). However the sequence obtained on proviral DNA fell within the diversity observed among the SGA clones confirming that they derived from the same sample. In the *vpu* gene, 12 sequences derived from unique subtype C molecules from 478HALD clustered together with the two subtype C sequences of patient MSM1157 corresponding to the second cluster of sequences as determined with SGA for this patient. The previously obtained bulk sequence on proviral DNA from the female 478HALD patient fell also in the cluster of SGA sequences. The genetic distance between the minority cluster of subtype C sequences from MSM1157 and subtype C sequences from 478HALD was 0.57%. In contrast subtype C sequences from 478HALD were different from those constituting the majority cluster of subtype C sequences from MSM1157 (genetic distance: 8.7%). Fig. 4 shows the phylogenetic trees for the sequences derived from single molecules by performing single genome amplification (SGA) for the two isolates (MSM1157 and 478HALD).

4. Discussion

In this study we analyzed to what extent dual infections with different HIV-1 variants occur in a population group with high risk behaviour, high HIV-1 prevalence and in an area where multiple HIV-1 subtypes and CRFs co-circulate. Our data show high rates of dual infection in the MSM population of Senegal. At least 11 (15.9%) of the 69 patients were simultaneously infected with two different HIV-1 subtypes and/or CRFs, and at least 11 (37.9%) to 14 (48.3%) of the 29 patients infected with subtype C in gag harbored two different subtype C variants. These data suggest that at least 22–25 (31.9–36.2%) of the 69 MSM from this study are infected with more than one HIV-1 strain. These are minimal estimates because the probes used in the MHA assay detected only 55/69 (79.7%) of HIV-1 infections in gag and 60/69 (86.9%) in *vpu*. This detection rates are somewhat lower than those previously reported for the development of the assay, i.e., 88.3% and 93.3% in gag and *vpu*, respectively (Vidal et al., 2013). However it has to be noted that in the MSM population, a high proportion of HIV-1 strains are grouped into transmission clusters (Diop-Ndiaye et al., 2009; Ndiaye et al., 2013), which could partially explain the higher

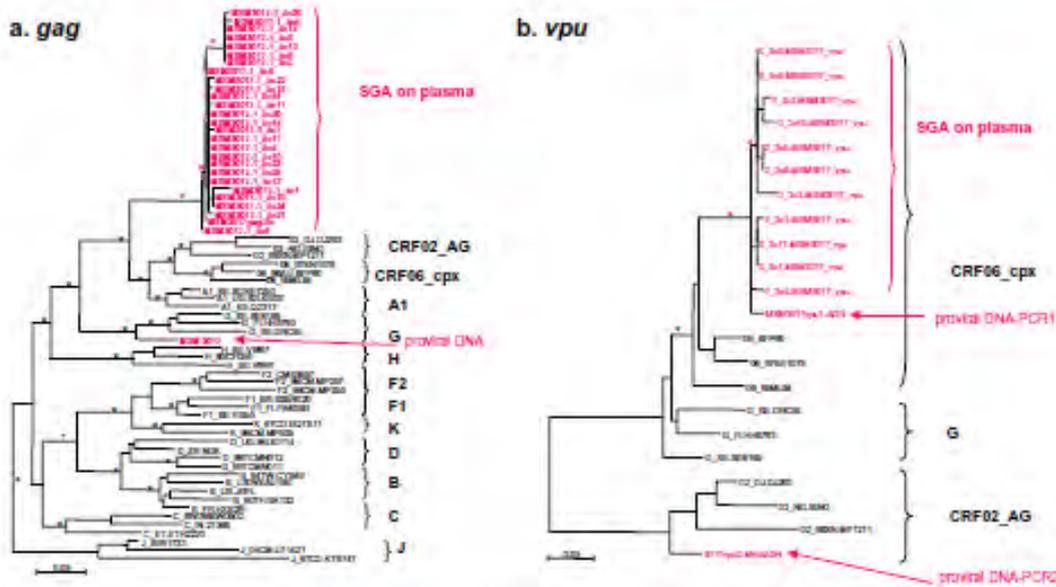


Fig. 3. Co-infection with multiple HIV-1 strains. Phylogenetic tree analysis in the *gag* (at 7 (333 bp) and *vpu* gene (184 bp) of sequences obtained from patient MSM3017 obtained by direct sequencing of amplified proviral DNA and by single genome amplification (SGA) of viral RNA in plasma. The sequences from the patient are highlighted in pink. Branch support values (aLRT, SH-like; (Anisimova and Gascuel, 2006)) above 0.80 were indicated with asterisk on the tree branches. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

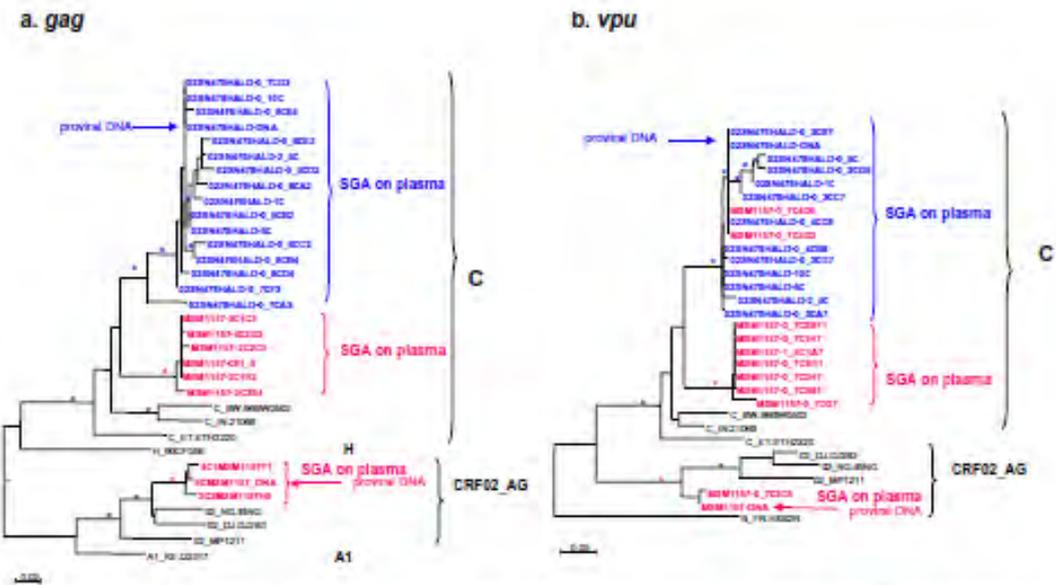


Fig. 4. Confirmation of co-infection with two HIV-1 subtype C variants plus CRF02_AG and evidence for exchange of HIV-1 strains between MSM and female HIV-1 infected patients in Senegal. Phylogenetic tree analysis in the *gag* at 7 (311 bp) and *vpu* gene (173 bp) of sequences obtained from patient MSM1157 (in pink) and female patient Q2SN-478/HALD (in blue) obtained by direct sequencing of amplified proviral DNA and by single genome amplification (SGA) of viral RNA in plasma. Branch support values (aLRT, SH-like; (Anisimova and Gascuel, 2006)) above 0.80 were indicated with asterisk on the tree branches. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

failure rate of our probes, especially when negative samples are from the same cluster. Indeed, a significant part of samples that did not respond to homologous probes fell into several clusters of very closely related sequences (48% in gag and 29% in vpu). Conversely, as the absence of probe hybridization was due to few mismatches between the probe and the sample sequences, the method might be optimized with the design of new probes. In addition underestimation of dual infection can also be due to co-infection with HIV-1 variants for which no probes are designed in our assay, for example subtype H, or CRF09_cpx, that are documented to circulate in Senegal (Toure-Kane et al., 2000; Diop-Ndiaye et al., 2010). Moreover, except for subtype C, and to some extent for CRF02_AG, our assay is not able to identify different intra subtype/CRF subclusters for the other subtypes and CRFs (Vidal et al., 2013).

In our previous report on the development of the MHA assay for West and West Central Africa, we validated the assay on a panel of samples representing different subtypes and CRFs that circulate in West and West Central Africa. In this panel, 70 samples from the general population corresponding to previously reported patients attending hospitals in Dakar and starting antiretroviral treatment were included (Vidal et al., 2013). In the general population from Senegal, HIV prevalence is less than 1%. Among these 70 patients (56 CRF02_AG, 3 A, 5 B, 5 C and 1 CRF06_cpx) only three (4.3%) samples were identified as dually infected by the MHA assay (Vidal et al., 2013). This rate is significantly lower than the 34.8% estimates in the MSM population. Other studies on high-risk group cohorts showed about 20% of dual infections in female sex-workers in East Africa or injecting drug users in India, and 9% in women at high risk of infection in South Africa infected with subtype C (Herbinger et al., 2006; Ssemwanga et al., 2012; Woodman et al., 2011; Sarkar et al., 2009; Rodriguez et al., 2009). However in these geographic regions the regional MHAs used target less variants due to a lower genetic diversity of HIV-1 strains.

Single genome amplification was done to confirm certain dual infections identified by MHA. Some dual infections could not be confirmed by SGA but it has to be noted that SGA is less sensitive than methods using deep-sequencing to detect co-infections (Redd et al., 2012). Importantly, it has to be noted that SGA of the dual subtype C infected patient demonstrated that the minority subtype C strain in vpu was identical to the majority strain carried by one woman five years ago. This observation clearly confirmed the intermixing of HIV-1 variants between different at-risk population groups from HIV infection, i.e., low-risk women and high-risk men. This was already previously suspected by behavioral data and frequent heterosexual contact of MSM to hide their homosexuality which is criminalized in Senegal (Poteat et al., 2011; Larmarange et al., 2009). Given the anonymous nature of the survey among MSM, it cannot be excluded that sample 478HALD is the female partner of MSM1157.

Within subtype C, two major subclusters can be identified, one that contains almost all subtype C strains from East Africa and Brazil and the other group that contains almost all strains from southern African countries and India (Jung et al., 2012; Delatorre and Bello, 2012). Both variants are present in Senegal, but the majority of them, including the MSM cluster, are close to those circulating in austral Africa, notably Zambia (Jung et al., 2012). In the gag region our assay is able to discriminate among them with the C1 and C2 probes. Surprisingly, in contrast to bulk sequencing which reveals always subtype C variants close to the southern African variants, MHA results suggest that about 50% of the subtype C infected MSM are also infected with the east African variant. The presence of two subtype C subpopulations was confirmed for one patient and the number of mismatches of the east-African subtype C probe was always too high to allow hybridization with the other C variant. These high rates of dual subtype C infections, not detected

by bulk sequencing, suggest that the east-African variant could be less fit and is outcompeted, however this needs to be studied more in depth by future *in vivo* and *in vitro* studies.

5. Conclusion

Our study shows high rates of dual infections with HIV-1 strains of different subtypes and/or CRFs but also within subtypes. Our results are minimal estimates. Comparison of dual infection rates between the general population and MSM in Senegal, show also clearly the importance of high HIV prevalence and high risk behavior in dual infections and subsequent intermixing of HIV-1 variants which can lead to emergence and spread of new recombinants (CRFs). We also showed intermixing of HIV-1 variants between low risk women and MSM, most likely related to stigmatization of MSM in Senegal. Efforts to support prevention programs targeting MSM and probably other risk groups in Senegal are still needed. Dual infections have a considerable impact on the increasing genetic diversity of HIV-1 worldwide, and represent an additional challenge for the development of a preventive vaccine.

6. Funding

Nafissatou Leye is a doctoral fellow from French Foreign Office. This study was supported by Grants of the French Service of Cooperation and Cultural Action (SCAC) in Senegal, from EIHos project (ANRS 12139) and ANRS 1297 from the National Agency for AIDS Research in France (ANRS) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

Acknowledgements

We thank Annabel Desgrées du Loû and Joseph Larmarange who initiated and coordinated the EIHos project in the MSM population.

References

- Amicizia, M., Giacchi, G., 2006. Approximate likelihood-of-infection for detecting a test, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 530–552.
- Bassi, S., Sifakis, F., Cleghorn, E., Boyce, C., 2010. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low and middle-income countries 2008–2010: a systematic review. *PLoS Med.* 4, e131.
- Cheney, S.H., Pambiani, A., Overbaugh, J., 2010. HIV-1 superinfection and its implications for vaccine design. *Curr. HIV Res.* 9, 504–601.
- Coriandrea, M., Postrowski, A.O., Grijsen, M.L., Zingales, F., Baloni, M., Bion, P., Pina, J.M., Janssens, S., van der Kap, A.C., 2012. HIV-1 dual infection is associated with faster CD4+ T-cell decline in a cohort of men with primary HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 54, 231–240.
- Delatorre, E.O., Bello, G., 2012. Phylogenetics of HIV-1 subtype C epidemic in east Africa. *PLoS One* 7, e41904.
- Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, C., Vidal, N., Niama, F.R., Niang-Diallo, P.A., Diaye, T., Gaye-Diallo, A., Wade, A.S., Fontey, M., Mboup, S., 2009. Surprisingly high prevalence of subtype C and specific HIV-1 subtype/CRF distribution in men having sex with men in Senegal. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52, 240–252.
- Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, C., Leye, N., Nyan-Guoye, N.F., Moustava, C., Fontey, M., Mboup, S., 2010. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naïve patients from Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 1133–1138.
- Gantsh, G.S., Nicolle, D.C., Jansen, M.A., Wong, K.G., Grobler, J., Li, F., Liu, S.L., Rademeyer, C., Inera, G.J., Karim, S.S., Williamson, C., Corey, L., Magniik, J.B., Mellors, J., 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363, 619–622.
- Guindon, S., Delsuc, F., Delsuc, J.F., Gascion, G., 2003. Estimating accurate bootstrap phylogenies with PhyML. *Methods Mol. Biol.* 217, 113–137.
- Hernandez, J., Gower, E., Glynn, P.D., Omaswa, S., 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25, 679–684.
- Herbinger, K.H., Gerhardt, M., Pyawattitip, S., Miska, D., Amey, M.A., Hoffmann, O., Malin, L., Sitt, D.L., Mubamba, D., McCutchan, F.E., Hoeltcher, M., 2006. Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeja region, Tanzania. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 595–606.
- Hosokawa, M., Dowling, W.E., Sanders-Buell, E., Gao, J.K., Harth, M.E., Thompson, A., Kelly, M.L., Sitt, D.L., McCutchan, F.E., 2002. Detection of HIV-1 subtypes,

- recombinants and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *AIDS* 16, 2055–2064.
- Jong M, Leye N, Vidal N, Fargette D, Diop H, Toure Kane C, Gaxiola G, Pomera M. 2012. The origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Senegal. *PLoS One* 7, e33579.
- Lemasang J, Degross-de-Lou A, Enel C, Wade AS, Groupe ELISa. 2009. Homosexuality and bisexuality in Senegal: a multifaceted reality. *Population* (E) 64, 635–666.
- Lemasang J, Wade AS, Diop A.K, Diop O, Guaye K, Maira A, Degross-de-Lou A.D, ELISa Group. 2010. Men who have sex with men (MSM) and factors associated with not using a condom at last sexual intercourse with a man and with a woman in Senegal. *PLoS One* 5, e13380.
- Munoz-Nieto M, Pérez-Alvarez L, Thomson M, Garcia V, Ocampo A, Casado G, Delgado E, Miralles C, de Parga E.V, Sierra M, Gutierrez G, Najera R. 2002. HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual infection with subtypes B and G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 137–141.
- Ndiaye H, Tchikape E, Vidal N, Ndiaye O, Diop A.K, Pomera M, Mboop S, Toure-Kane C. 2013. HIV-1 subtype C remains the predominant subtype in men having sex with men in Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 1265–1272.
- Pomas M, Casado G, Sanchez R, Perez-Hidalgo M, Lopez-Galvez C. 2006. A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primary infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 12–18.
- Potrat T, Douz D, Dramé FM, Niaw M, Tsiouri C, Dhalwal M, Boyer C, Bassi S. 2011. HIV risk among MSM in Senegal: a qualitative rapid assessment of the impact of enforcing laws that criminalize same sex positions. *PLoS One* 6, e23780.
- Roda A.D, Mallis CE, Sowah D, King X, Maman S, Kiehl S.M, Tobias A.A, Xiao C, Guboweki M.K, Nkoyinda F, Kigali G, Lanyadozi O, Kagame J, Sewankambo N, Gray RH, Prucha SF, Wasser MJ, Quinn TC. 2012. The rate of HIV superinfection and primary HIV incidence in a general population in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* 206, 267–274.
- Rodriguez MA, Drey M, Rietser D, Chen V, Tripathy S.P, Kulkarni S.S, Chatterjee K, Tarwater PM, Gupta P. 2000. High replication fitness and transmission efficiency of HIV-1 subtype C from India: implications for subtype C predominance. *Virology* 305, 436–444.
- Salazar-Gonzalez JF, Bakke S, Pham K.T, Salazar MG, Guffey M.B, Keele S.F, Donnell CA, Frazier P, Hootner E, Altm S, Mangat O, Mulemba J, Anderson JA, Swastrom R, Haynes BF, Abney GS, Korber BT, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. 2008. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol.* 82, 3982–3993.
- Sarkar R, Sengupta S, Mukherjee R, Singh NR, Sarkar K, Chakrabarti S. 2009. Implementation of a multigenic hybridization assay to characterize HIV-1 strains detected among injecting drug users in Mysore, India. *Intervirology* 52, 175–178.
- Smith DM, Wong JK, Hightower GK, Iguchi CC, Kostich KK, Petropoulos CJ, Richman DD, Limir SJ. 2005. HIV drug resistance acquired through superinfection. *AIDS* 19, 1251–1256.
- Solomon SS, Mehta S, Latimore A, Srikrishnan A.K, Giannini D.D. 2010. The impact of HIV and high-risk behaviours on the wives of married men who have sex with men and injection drug users: implication for HIV prevention. *J. Int. AIDS Soc.* 13, 57.
- Steinwagga D, Ndimbi N, Lyagha F, Bukonya J, Soolay J, Vanleijck J, Grosskurth H, Kalishu P. 2012. HIV type 1 subtype distribution, multiple infections, sexual networks, and partnership histories in female sex workers in Kampala, Uganda. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 157–165.
- Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Guaye FM, Sow PS, Ndiaye I, Gaye-Diallo A, Delaporte E, Pomera M, Mboop S. 2003. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal: a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19, 605–608. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC981976/>; accessed on 19 June 2013.
- van der Kuyl AC, Gmelink M. 2007. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology* 4, 63.
- Vidal N, Diop H, Montavon C, Bouni C, Bouch S, Ngile EM, Toure-Kane C, Mboop S, Delaporte E, Pomera M. 2013. A novel multigenic hybridization assay reveals high frequency of dual HIV-subtype infections among HIV-positive individuals in Gambia, west central Africa. *Infect. Genet. Evol.* 14, 73–82.
- Wade AS, Lemasang J, Diop A.K, Diop O, Guaye K, Maira A, Smit A, Enel C, Niang Diata P, Toure Kane C, Mboop S, Degross-de-Lou A. 2010. Infection in risk-taking behavior among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and other STDs. *ELISa Prepa, ANRS 12130. AIDS Care* 22, 405–414.
- Wardman Z, Mlomo K, Fournier P, Abrahams MR, Thobak R, Kaitu SA, Williamson C. Capriva Acute Infection Study Team. 2011. Short communication: decreased incidence of dual infections in South African subtype C-infected women compared to a cohort ten years earlier. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27 (11), 1167–1172.
- Zhang M, Frick B, Schultz AR, Meeks JP, Hilli I, Stanek M, Margolis R, Korber B, LeRoux T. 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7, 25.

Research article

Prevalence and behavioural risks for HIV and HCV infections in a population of drug users of Dakar, Senegal: the ANRS 12243 UDSEN study

Annie Leprêtre^{5,1}, Idrissa Ba², Karine Lacombe^{5,3,4,5}, Maryvonne Maynard⁵, Abdalla Toufik¹, Ousseynou Ndiaye⁶, Coumba Toure Kane⁷, Joël Gozlan^{3,8}, Judicaël Tine⁵, Ibrahim Ndoye⁵, Gilles Raguin^{9,4} and Pierre-Marie Girard^{3,4,5}

¹Corresponding author: Annie Leprêtre, Institut de Médecine et d'Épidémiologie Appliquée, Université Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, FR-75018 Paris, France. Tel: +33 1 39 59 71 71. Fax: +33 1 39 59 71 71. (allepretre@gmail.com); Karine Lacombe, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, FR-75012 Paris, France. Tel: +33 1 49283137. Fax: +33 1 49282149. (karine.lacombe@sataphp.fr)

Abstract

Objectives: Data on the extent of drug use and associated HIV, hepatitis C and hepatitis B infection in West Africa are lacking. The objectives of ANRS12244 UDSEN study were to estimate the size of the heroin and/or cocaine drug user (DU) population living in the Dakar area (Senegal), and assess the prevalence and risk factors of HIV, hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV), including behavioural determinants in this population, in order to set up an integrated prevention and treatment programme for DUs.

Design and methods: A capture-recapture method was applied for population size estimation, whereas the respondent-driven sampling (RDS) method was used to recruit a sample of DUs living in the Dakar area and determine HIV, HBV and HCV prevalence. Behavioural data were gathered during face-to-face interviews, and blood samples were collected on dried blood spots for analysis in a central laboratory. Data analysis was performed using the RDS analysis tool, and risk factors were determined by logistic regression. Access to laboratory results was organized for the participants.

Results: The size of the DU population in the Dakar area was estimated to reach 1324 (95% confidence interval [95% CI: 1281–1367]). Based on the 506 DUs included in the study, the HIV, HCV and HBV prevalence were 5.2% (95% CI: 3.8–6.3), 23.3% (95% CI: 21.2–25.2) and 7.9% (95% CI: 5.2–11.1), respectively. In people who inject drugs (PWID), prevalence levels increased to 9.4% for HIV and 38.9% for HCV ($p=0.001$ when compared to those who never injected). Women were more at risk of being HIV infected (prevalence: 13.04% versus 2.97% in males, $p=0.001$). Being PWID was a risk factor for HCV and HIV infection (odds ratio, OR: 2.7, 95% CI: 1.7–4.3, and OR: 4.3, 95% CI: 1.7–10.7, respectively), whereas older age and female sex were additional risk factors for HIV infection (10% increase per year of age, $p=0.03$ and OR: 4.9, 95% CI: 1.6–156, respectively). No specific determinant was associated with the risk of HBV infection.

Conclusions: High HIV and HCV prevalence were estimated in this population of DUs (including non-injectors) living in the Dakar area, Senegal, whereas HBV prevalence was close to that of the global Senegalese population, reflecting a risk of infection independent of drug use. Women seem to be highly vulnerable and deserve targeted interventions for decreasing exposure to HIV, while behavioural risk factors for HIV and HCV include the use of unsafe injections, reflecting the urgent need for developing harm reduction interventions and access to opioid substitution therapy services.

Keywords: human immunodeficiency virus; hepatitis C virus; hepatitis B virus; drug use; Senegal; respondent-driven sampling.

Received 28 October 2014; Revised 24 March 2015; Accepted 22 April 2015; Published 3000

Copyright © 2015 Leprêtre A et al; licensee International AIDS Society. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Until recently, illicit drug use was not considered an important route of HIV transmission in sub-Saharan Africa. Consequently, coverage of HIV prevention, treatment and care services to drug users (DUs) populations continued to be very low, with the lowest rates reported in sub-Saharan Africa [1]. However, recent data clearly demonstrate that the number of countries in which people use illegal drugs (including by injection) is growing, fuelling the HIV epidemic. In 2010, during the XVIII International AIDS Conference, the Vienna declaration called on governments and international organi-

zations to urgently reorient drug policies and implement science-based public health approaches to address the harm stemming from drug injecting (www.sciencedaily.com/releases/2010/06/100628101446.html, last accessed 10 March 2015). The United Nations Office on Drugs and Crime has issued warnings on the increasing trafficking and use of drugs in sub-Saharan Africa, including West Africa [2]. A systematic review in 2008 on injecting drug use and HIV did not report any data from francophone African countries, whereas scarce data were collected from Kenya, Nigeria and South Africa [1], where the HIV prevalence among people who inject drugs

(PWID) was, respectively, estimated at 42.9, 5.5, and 12.4% and more recently at 34.8% in Tanzania [3]. In the plea "Time to act" [4], authors highlighted evidence from several sub-Saharan African countries where the use of injecting drugs was rapidly increasing and was associated with a spread of HIV infection. A cross-sectional study conducted in 2010 in six states in Nigeria provides the only data available for PWID in West Africa and reported the high heterogeneity in the prevalence across states, from 0.3 to 9.3%, with a prevalence higher than 5% in three of the six states [5]. Moreover, studies conducted in sub-Saharan Africa have demonstrated that there is a strong association between the risk of HIV acquisition and alcohol use [6] and that consumption of stimulant drugs such as cocaine or crack induces high-risk sexual behaviours [7,8].

Despite the threat of a higher prevalence and transmissibility of viral hepatitis among PWID, detailed data on hepatitis C virus (HCV) are rare in sub-Saharan Africa, as noted in a systematic review in 2011 [9]. Prevalence of HCV antibodies in PWID was available in only 4 of the 17 countries where injecting drug use has been identified. As expected, HCV prevalence was much higher than HIV within a range of 97.3% in Mauritius, 51.4% in Kenya, 40.1% in Ghana and 22.2% in Tanzania. Last, non-injecting drug use is also recognized as an emerging risk factor for HCV acquisition [10] with a prevalence ranging from 2.3 to 35.3%.

In Senegal, the HIV epidemic is concentrated with a low prevalence in the general population (0.7% with a 1.6 female/male ratio) [11] and a high prevalence among key populations most at risk of HIV exposure, such as female sex workers (18.5%) and men who have sex with men (21.8%) [12]. However, no data on HIV prevalence among DUs are available despite the fact that injecting drug use was reported in specific areas of the Dakar region [13]. Data on HCV prevalence are even scarcer. A recent review reported a 3% rate in the general population [14], whereas a cross-sectional study of a blood donor population found a 0.49% rate of HCV antibodies [15]. A local survey conducted in 2008 to 2009 has shown that smoking is the main route of consumption of heroin, cocaine and crack [16]. Furthermore, those who do not inject are often connected to PWID. This might constitute a reservoir for HCV and HIV transmission through the community, inasmuch as crack use has been proved to be a risk factor for HIV and HCV in Europe [17].

Therefore, we designed a survey to estimate the size of the heroin and/or cocaine DU population living in the Dakar area (whatever the patterns of use), to assess HIV and HCV prevalence in this population and to analyze related behavioural risk factors in order to set up an integrated prevention and treatment programme for DUs.

Patients and methods

Study design and participants

The Dakar area is the most populated region of Senegal, accounting for 23% of the total population ($n = 12,526,488$) and 75% of the urban population [11]. The legal and social context of drug use is repressive, and there is no access to opioid substitution treatment and specialized care.

The study, conducted between April and July 2011, had two components: a capture-recapture component that estimated the size of the Dakar region's DU population, and a cross-sectional survey based on the respondent-driven sampling (RDS) methodology to estimate HIV and HCV prevalence within this population. DUs were defined as having used heroin and/or cocaine or injected any psychoactive substance during the last three months. The capture-recapture method consists of a random distribution of a numbered token within the target population during the week preceding the cross-sectional survey and its recapture within the population included in the survey. RDS is a long-chain referral methodology that has been developed to provide access to difficult-to-reach populations [18]. Recruitment starts with the so-called "seeds" known to be representative of the DU population's diversity. Seeds are instructed to give a recruitment coupon to a maximum of three other peers from their own social network and, in turn, they receive double incentives, one for their participation and one for succeeding in recruiting peers. Limiting the number of peers who could be recruited by each participant avoids biases associated with the snowballing sampling method, which has the drawback of increasing the risk of not reaching hidden individuals. Recruitment proceeds in successive waves of recruited peers. Using a mathematical system for weighting the sample to compensate for its not having been drawn as a simple random sample, a final population sample is obtained and used to measure study outcomes.

Inclusion criteria were as follows: being a heroin and/or cocaine user, having injected any psychoactive substance during the last three months, being over 18 years of age (or 15 in cases of proven emancipation), living for at least three months in the Dakar region, and giving informed consent to participate in the study. In order to minimize the risk of including the same participant twice, three basic biometric measures (height, size of wrist and distance from elbow to end of third finger) were reported on a computerized database [19]. The initial sample size was fixed at 266 individuals (design effect of two with unilateral test, initial indicator $P1 = 0.50$ and $P2 = 0.65$, with an α risk of 5% and an 80% power).

Study procedures

The study was preceded by a feasibility survey (December 2008 to January 2009), aimed at identifying institutional key partners (Ministry of Health, CILD, CNLS, PWVIH, NGO, and care and treatment centres), identifying and briefly describing the target population, identifying the study centre and assessing the needs for survey staff training. An outreach team including former DUs acting as peers, social workers and volunteers conducted field work for six months to increase trust between DU communities and interviewers and to have a better understanding of the DU network in the Dakar area.

The capture-recapture study preceded the RDS survey by one week (11 to 17 April 2011). Tokens were randomly distributed as pre-numbered cardboards in the different spots where DUs usually gathered, to all DUs matching the inclusion criteria of the RDS study, and then recaptured

during the RDS survey. Participants of the study were not informed on the reason why tokens were distributed, on the award when bringing the token back or on the implementation of the RDS study. This ensured the independence of both samples. The total number of tokens distributed in the community has been precisely noted (capture) in order to estimate the number of tokens collected from patients presenting to the study research base during the RDS study (recapture).

During the RDS survey phase (19 April to 15 July 2011), two to three seeds per area covered by the study were initially selected for a total of eight seeds. Of all seeds recruited per area, one had to be a woman, one under 25 years of age, one a PWID, one a heroin user and one a crack user (those characteristics could be combined). Each recruited seed received a maximum of three coupons to be distributed to peers. The study research base was located on the Fann University Hospital premises. Each eligible individual filled out a face-to-face behavioural questionnaire and had a blood sample collected on a dried blood spot (DBS). The questionnaire was administered in the most common language (Wolof) using a back translation from French, following the method described here: [www.who.int/substance_abuse/research_tools/translation/en/]. The sociobehavioural questionnaire contained items regarding sociodemographical characteristics, present and past drug use practices, knowledge of HIV and HCV transmission modes, access to care and testing, sexual risk behaviours and previous jail experience. Compensation for participation (4000 FCFA) and transport (3000 FCFA) was set at a total amount of 7000 FCFA (11 €) and given when visiting the study centre, whereas the facilitators who recruited DUs in the survey received 4000 FCFA (6 €), provided that the DU inclusion was effective.

During the recruitment, DBS were prepared from finger pricks. For each patient, five spots were placed on a five-spot blotter 903[®] (Whatman GmbH, Dassel, Germany) and dried for at least three hours at room temperature. They were then centralized in the virology lab of the study centre (CRCF) in Dakar. Most of the DBS were kept at 4°C for two weeks before being frozen. HIV testing was done according to the national algorithm using the Determine[®] HIV-1/2 Ag/Combo kit (Alere Medical Co., Matsuhidai, Matsudo-shi, Chiba, Japan) and confirmed with ImmunoComb[®] II HIV1 & 2 BiSpot kit (Organics, Yavne, Israel). Antibody elution from the DBS was performed in 200 µl of the PBS buffer, and 50 µl was used for each technique according to the manufacturer's instructions. HCV and HBV serology were performed, respectively, with the VEDALAB-HCV-CHECK-1 kit and HEP-CHECK-1 kit (VEDA LAB, Alencon, France). For each technique, 100 and 20 µl were used for HBV and HCV, respectively, according to the manufacturer's instructions.

Outcomes

The primary outcomes were the estimation of the size of the DU population within the Dakar area and the prevalence of HIV, HCV and HBV with its 95% confidence interval (95% CI). Secondary outcomes included the prevalence of HIV, HCV and HBV infection in the study population based on serologies performed from DBS, and the assessment of the relative risk

of HIV, HBV and HCV infections based on the information obtained through the sociobehavioural questionnaire.

Statistical analysis

RDSAT version 5.6 was used to estimate the prevalence of HIV, HCV and HBV infections based on the sample population and allowed adjustments on parameters such as homophily and difference in network size, known to cause possible biased estimates.

The capture-recapture method was applied to the estimation of the total size of the DU population in Dakar. The estimation was based on the equation: $N = (n1 \times n2) / m$, where $n1$ is the number of DUs who got a token (capture), $n2$ is the number of DUs included in the RDS study (recapture) and m is the number of participants common to both groups (DUs with a token).

Descriptive statistics were applied to the characteristics of the survey population. Categorical variables were reported with their percentages and compared using the chi-squared test (and Fisher's test for small numbers). Continuous variables were expressed by their means (standard deviation) or medians (interquartile range), and comparisons were with the Student and Wilcoxon ranked tests according to the variable distribution. A simple logistic regression was applied to select variables associated with the outcome, and all variables with $p < 0.1$ were entered in a multiple logistic regression model for each outcome. Statistical analysis was performed using STATA (v11.2; College Station, TX, USA), and significance was determined as $p < 0.05$.

Ethical considerations

All participants provided informed oral and written consent to participate in the study. After answering the questionnaire, individuals had a pretest counselling session about HIV and HCV prevention. Within one week, the blood test results were confidentially delivered in the Outpatient Treatment Centre (Centre de Traitement Ambulatoire) near the research centre. Participants also received post-test counselling and all HIV- and/or HCV- or HBV-positive patients were offered an appointment free-of-charge with an infectious diseases specialist in the same hospital. Counselling and blood tests were also offered to non-included individuals. Anonymity was ensured throughout the process by the attribution of a unique number with no connection to identity, unless the participant who turned out to be HIV, HBV or HCV infected, accepted the appointment with the infectious diseases specialist. Finally, all study partners discussed the appropriate amount for incentives distributed to recruiters and defined it according to common practices and rates for Senegalese clinical research. The study protocol was reviewed and approved by the National Ethical Committee for Research in Health.

Results

Population size and HIV, HBV and HCV prevalence

The estimation of the population size has been performed based on 416 distributed tokens. The estimated DU population in Dakar vicinities was an average of 1324 (95% CI: 1281–1367).

In total, 625 DUs were recruited from the eight initial seeds, among which 506 have been included in the survey.

Among the 119 non-included individuals, 81 could not adequately prove that they were active DUs of heroin and/or cocaine/crack (most of them were using cannabis), 26 had not used drugs in the past three months and 12 were excluded for other reasons (fear of blood tests, no time for the questionnaire, etc.). In total, 610 had a serological test performed (15 refused to be tested). As of 15 November 2011, 226 participants (37%) came to get their results. Compared to those who did not come back, they were more often males (39.5% versus 17.2%, $p < 0.001$), older (43.8 versus 34.1 years of age, $p < 0.001$), more susceptible to be included in the study (41.5% versus 13.4%, $p < 0.001$) and less likely to have injected drugs within the past six months (30.7% versus 43.8%, $p = 0.02$).

The prevalence of HIV, HBV and HCV in the DU population living in the Dakar area were estimated to be 5.2% (95% CI: 0.038–0.063), 7.9% (95% CI: 5.2–11.1) and 23.3% (95% CI: 0.212–0.252), respectively.

In the sample ($n = 506$), the total number of HIV, HBV and HCV infection was 22 (4.3%), 45 (8.9%) and 120 (23.8%), respectively. The HIV prevalence was significantly different between DUs having injected drugs at least once in their life and those who never injected: 9.4% versus 2.5% ($p = 0.001$), women and men: 13% versus 3% ($p = 0.001$), even for those having injected drugs at least once: 21.1% versus 7.5% ($p = 0.0001$). The HCV prevalence was significantly different between DUs who injected drugs at least once in their lives and those who never did: 38.85% versus 18% ($p = 0.0001$). Sex did not influence the prevalence of HCV (32.0% in females versus 22.9%, $p = 0.2$) or HBV (4.3% in females versus 9.6%, $p = 0.2$). Age was marginally positively associated with HIV prevalence ($p = 0.007$), but not with HCV or HBV prevalence.

Among the 22 HIV-positive patients from the study sample, 13 (59.1%) and 2 (9%) were also HCV or HBs-Ag co-infected, respectively. Conversely, among the 120 HCV-positive and 45 HBs-Ag positive patients from the study sample, the prevalence of HIV-HCV or HIV-HBV co-infections was 10.8% and 4.4%, respectively.

Characteristics of the survey population

The survey population was predominantly male ($n = 437$, 86.4%) with a mean age of 42.1 years (SD 10.4). Most DUs ($n = 356$, 70.4%) were single, divorced or widowed. The education level was relatively low, in accordance with the reported rates in the general population [11], 51.2% ($n = 259$) had none or went only to primary or Koranic school, but 18.9% had attended high school and/or university. The majority ($n = 296$, 58.6%) lived with their parents and only four had no stable housing during the previous three months. A small majority ($n = 300$, 59.3%) had a paid occupation. A history of incarceration was reported by 61.9% of participants, and 29.2% of them acknowledged having consumed drugs within the jail premises. Among all participants, 27.7% ($n = 140$) reported having injected drugs at least once in their lives, and 38.9% ($n = 197$) had already received care for addiction. Only 29.4% had been tested for HIV (none reporting a positive result), 4.2% for HBV and 3.9% for HCV (one reported a positive result).

In the month prior to survey, the use of drugs was as follows: heroin = 91.5%, cannabis = 64%, crack = 49.4%, alcohol = 49%, benzodiazepines = 29.8% and cocaine = 13.6%. Consumption of more than three drugs was noted in 291 (57.5%) DUs. The concomitant use of pain killers such as paracetamol was frequent (26.9%), and 27 patients reported occasional opiate substitution consumption (two methadone and five buprenorphin), although these drugs had no legal existence in 2011 in Senegal.

Mean age at heroin, crack and cocaine initiation was 27.9 years (SD: 8.2), 28.9 years (SD: 8.5) and 29.3 years (SD: 8.3), respectively. However, initiation of heroin and crack use occurred before the age of 22 and 23, respectively, in 25% of the participants. Cannabis and alcohol consumption began earlier, at a mean age of 20.5 years (SD: 7.0) and 21.4 years (SD: 7.4), respectively, whereas benzodiazepines consumption began later at a mean age of 31.5 years (SD: 11.0). For those who had ever injected once, the first injection occurred at a mean age of 30.8 years (SD: 8.2).

Among the participants who used heroin, 367 (72.5%) would take it every day, whereas crack was consumed once a week or less by 176 participants (70.4% of crack users), and cocaine once a week or less by 43 participants (62.3% of cocaine users). Cannabis was also consumed daily by 202 participants (62.4%), as was alcohol and benzodiazepines (33.1% and 29.8% of daily consumption, respectively).

The most frequent route of heroin absorption was smoking (68.0%), then snorting (52.1%) and injection (14.0%). Cocaine was mainly smoked (71.0%), followed by snorting (43.5%) and injection (15.9%). Crack and cannabis were smoked (100 and 97%, respectively). Injections never occurred for pills such as benzodiazepines. For participants who injected, the date of the last injection was within the month preceding the study (70%), and 12.9% shared needles with other injectors, whereas more than a quarter of them shared other injection materials (water used for drug dilution: 27.1%; water used to wash equipment: 21.4%; spoon 34.3% and filter: 27.1%). Personal syringes were re-used by 60% of injectors, after cleaning in 72% of cases, mostly with water (60%). For 33.9%, the last injection occurred outside the home (reflecting the precarious situation of some PWID). In the 86% of participants who smoked drugs within the past month ($n = 435$), 60.2% have shared pipes or other oral devices, and in the 49% of participants who snorted ($n = 251$), 27.1% have shared straws or other intranasal devices.

Regarding sexual intercourse, 80.4% of participants reported being sexually active within the last 12 months, of which 45.7% reported sex with more than one partner, and the majority (65%) rarely or never used condoms. One-time paid sexual relationships were reported by 26.8% of participants.

Special focus on women

Women included in the study ($n = 69$) were younger than men (36.1 versus 43.0 years, $p = 0.0001$). A higher proportion had a precarious family situation (divorced, single, widowed or separated) (83% versus 68% for men, $p = 0.01$) and no or a low level of education (71% versus 48% for men, $p < 0.0001$). The two drugs most frequently used were heroin and crack (79% and 46% of all women, respectively). Women started

Among the 119 non-included individuals, 81 could not adequately prove that they were active DUs of heroin and/or cocaine/crack (most of them were using cannabis), 26 had not used drugs in the past three months and 12 were excluded for other reasons (fear of blood tests, no time for the questionnaire, etc.). In total, 610 had a serological test performed (15 refused to be tested). As of 15 November 2011, 226 participants (37%) came to get their results. Compared to those who did not come back, they were more often males (39.5% versus 17.2%, $p < 0.001$), older (43.8 versus 34.1 years of age, $p < 0.001$), more susceptible to be included in the study (41.5% versus 13.4%, $p < 0.001$) and less likely to have injected drugs within the past six months (30.7% versus 43.8%, $p = 0.02$).

The prevalence of HIV, HBV and HCV in the DU population living in the Dakar area were estimated to be 5.2% (95% CI: 0.038–0.063), 7.9% (95% CI: 5.2–11.1) and 23.3% (95% CI: 0.212–0.252), respectively.

In the sample ($n = 506$), the total number of HIV, HBV and HCV infection was 22 (4.3%), 45 (8.9%) and 120 (23.8%), respectively. The HIV prevalence was significantly different between DUs having injected drugs at least once in their life and those who never injected: 9.4% versus 2.5% ($p = 0.001$), women and men: 13% versus 3% ($p = 0.001$), even for those having injected drugs at least once: 21.1% versus 7.5% ($p = 0.0001$). The HCV prevalence was significantly different between DUs who injected drugs at least once in their lives and those who never did: 38.85% versus 18% ($p = 0.0001$). Sex did not influence the prevalence of HCV (32.0% in females versus 22.9%, $p = 0.2$) or HBV (4.3% in females versus 9.6%, $p = 0.2$). Age was marginally positively associated with HIV prevalence ($p = 0.007$), but not with HCV or HBV prevalence.

Among the 22 HIV-positive patients from the study sample, 13 (59.1%) and 2 (9%) were also HCV or HBs-Ag co-infected, respectively. Conversely, among the 120 HCV-positive and 45 HBs-Ag positive patients from the study sample, the prevalence of HIV-HCV or HIV-HBV co-infections was 10.8% and 4.4%, respectively.

Characteristics of the survey population

The survey population was predominantly male ($n = 437$, 86.4%) with a mean age of 42.1 years (SD 10.4). Most DUs ($n = 356$, 70.4%) were single, divorced or widowed. The education level was relatively low, in accordance with the reported rates in the general population [11], 51.2% ($n = 259$) had none or went only to primary or Koranic school, but 18.9% had attended high school and/or university. The majority ($n = 296$, 58.6%) lived with their parents and only four had no stable housing during the previous three months. A small majority ($n = 300$, 59.3%) had a paid occupation. A history of incarceration was reported by 61.9% of participants, and 29.2% of them acknowledged having consumed drugs within the jail premises. Among all participants, 27.7% ($n = 140$) reported having injected drugs at least once in their lives, and 38.9% ($n = 197$) had already received care for addiction. Only 29.4% had been tested for HIV (none reporting a positive result), 4.2% for HBV and 3.9% for HCV (one reported a positive result).

In the month prior to survey, the use of drugs was as follows: heroin = 91.5%, cannabis = 64%, crack = 49.4%, alcohol = 49%, benzodiazepines = 29.8% and cocaine = 13.6%. Consumption of more than three drugs was noted in 291 (57.5%) DUs. The concomitant use of pain killers such as paracetamol was frequent (26.9%), and 27 patients reported occasional opiate substitution consumption (two methadone and five buprenorphin), although these drugs had no legal existence in 2011 in Senegal.

Mean age at heroin, crack and cocaine initiation was 27.9 years (SD: 8.2), 28.9 years (SD: 8.5) and 29.3 years (SD: 8.3), respectively. However, initiation of heroin and crack use occurred before the age of 22 and 23, respectively, in 25% of the participants. Cannabis and alcohol consumption began earlier, at a mean age of 20.5 years (SD: 7.0) and 21.4 years (SD: 7.4), respectively, whereas benzodiazepines consumption began later at a mean age of 31.5 years (SD: 11.0). For those who had ever injected once, the first injection occurred at a mean age of 30.8 years (SD: 8.2).

Among the participants who used heroin, 367 (72.5%) would take it every day, whereas crack was consumed once a week or less by 176 participants (70.4% of crack users), and cocaine once a week or less by 43 participants (62.3% of cocaine users). Cannabis was also consumed daily by 202 participants (62.4%), as was alcohol and benzodiazepines (33.1% and 29.8% of daily consumption, respectively).

The most frequent route of heroin absorption was smoking (68.0%), then snorting (52.1%) and injection (14.0%). Cocaine was mainly smoked (71.0%), followed by snorting (43.5%) and injection (15.9%). Crack and cannabis were smoked (100 and 97%, respectively). Injections never occurred for pills such as benzodiazepines. For participants who injected, the date of the last injection was within the month preceding the study (70%), and 12.9% shared needles with other injectors, whereas more than a quarter of them shared other injection materials (water used for drug dilution: 27.1%; water used to wash equipment: 21.4%; spoon 34.3% and filter: 27.1%). Personal syringes were re-used by 60% of injectors, after cleaning in 72% of cases, mostly with water (60%). For 33.9%, the last injection occurred outside the home (reflecting the precarious situation of some PWID). In the 86% of participants who smoked drugs within the past month ($n = 435$), 60.2% have shared pipes or other oral devices, and in the 49% of participants who snorted ($n = 251$), 27.1% have shared straws or other intranasal devices.

Regarding sexual intercourse, 80.4% of participants reported being sexually active within the last 12 months, of which 45.7% reported sex with more than one partner, and the majority (65%) rarely or never used condoms. One-time paid sexual relationships were reported by 26.8% of participants.

Special focus on women

Women included in the study ($n = 69$) were younger than men (36.1 versus 43.0 years, $p = 0.0001$). A higher proportion had a precarious family situation (divorced, single, widowed or separated) (83% versus 68% for men, $p = 0.01$) and no or a low level of education (71% versus 48% for men, $p < 0.0001$). The two drugs most frequently used were heroin and crack (79% and 46% of all women, respectively). Women started

Table 2. Risk factors for HIV infection

Variables ^a	HIV status		p	Crude OR (95%CI)	p	Adjusted OR (95%CI)	p
	HIV + (n = 22)	HIV - (n = 484)					
Sex (n, %)							
Male	13 (59.1)	424 (87.6)		1		1	
Female	9 (40.9)	60 (12.4)	0.001	4.9 (2.01–11.9)	0.0001	4.9 (1.6–15.6)	0.007
Paid sexual relationships at least once (n, %)							
No	12 (54.5)	361 (74.6)		1		1	
Yes	10 (45.5)	123 (25.4)	0.09	2.4 (1.03–5.8)	0.04	1.5 (0.5–4.6)	0.4
Age, mean (SD), OR per year	46.0 (9.3)	41.9 (10.4)	0.07	1.04 (1.00–1.1)	0.08	1.1 (1.004–1.1)	0.03
History of injection at least once (n, %)							
No	9 (40.9)	357 (73.8)		1		1	
Yes	13 (59.1)	127 (26.2)	0.002	4.1 (1.7–9.7)	0.002	2.9 (1.06–7.9)	0.04
Use of heroin by injection (n, %)							
No	14 (63.6)	427 (88.2)		1			
Yes	8 (36.4)	57 (11.8)	0.004	4.3 (1.7–10.7)	0.002	– ^b	–

^aOnly variables associated with outcome at $p < 0.1$ in univariate analysis are reported in the table; ^bbecause of a strong collinearity between the variables "injector status" and "use of heroin by injection," only the first has been kept in the multivariable model.

Table 3. Risk factors for HCV infection

Variables ^a	HCV status		p	Crude OR (95% CI)	p	Adjusted OR (95% CI)	p
	HCV + (n = 120)	HCV - (n = 386)					
Single, divorced, widowed (n, %)							
No	26 (22.7)	124 (32.1)		1		1	
Yes	94 (78.3)	262 (67.9)	0.03	1.7 (1.05–2.8)	0.03	1.81 (1.1–3.04)	0.02
Paid sexual relationships within past 12 months (n, %)							
No	81 (67.5)	292 (75.6)		1		1	
Yes	39 (32.5)	94 (24.4)	0.09	1.49 (0.95–2.3)	0.08	1.2 (0.9–1.9)	0.4
Care sought for heroin use (n, %)							
No	72 (60.4)	267 (69.2)		1		1	
Yes	48 (39.6)	119 (30.8)	0.08	1.6 (0.98–2.3)	0.06	1.2 (0.7–1.9)	0.5
Duration of relationship with study recruiter, days (mean, SD), OR per day				1.001 (1.0002–1.003)	0.02	1.001 (1.0–1.002)	0.05
History of injection at least once (n, %)							
No	65 (54.2)	301 (77.8)		1		1	
Yes	55 (45.8)	85 (22.2)	0.0001	3.0 (1.9–4.6)	0.0001	2.7 (1.7–4.3)	0.0001
Use of heroin by injection (n, %)							
No	89 (74.2)	352 (91.2)		1			
Yes	31 (25.8)	34 (8.8)	0.0001	3.6 (2.1–6.2)	0.0001	– ^b	–
Injection of drugs during trip abroad (n, %)							
No	104 (86.7)	362 (93.8)		1			
Yes	16 (13.3)	24 (6.2)	0.03	1.6 (0.8–3.3)	0.2		

^aOnly variables associated with outcome at $p < 0.1$ in univariate analysis are reported in the table; ^bbecause of a strong collinearity between the variables "injector status" and "use of heroin by injection," only the first has been kept in the multivariable model.

not clear. One might speculate that despite precarious living conditions, a very small fraction of the participants were homeless (4/506), most of them living with their families. The strength of family structure may prevent youngsters from turning to heavy drug use. Indeed, the DUs included in the study mostly lived in precarious conditions, characterized by "social disqualification" in Senegal: previous incarceration for nearly 50% of them and insufficient income to have autonomous housing (although homelessness is very uncommon in Senegal, unlike other African countries [21]).

The HIV prevalence found among heroin and/or cocaine users is seven times higher than among the general population and is strongly linked to the practice of injection (HIV prevalence of 9.4% in injectors) and sex (HIV prevalence of 13% in women). Women are also more exposed to HIV through injection (21.1% versus 7.5% for men) [24]. The HIV prevalence in DUs who had never used injection is four times higher than in the overall Senegalese population [5]. This might be due to the exposure to sexual risk through paid sex, underuse of condoms and multiple sexual partnerships in a context of precariousness [12,14]. These findings deserve further research to better understand the dynamics of the HIV epidemics in non-injecting DUs. Regarding the prevalence of HIV among females, the estimate found in our study is close to that of female sex workers in Senegal, shedding light on the necessity of taking into account drug use in prevention programmes among female sex workers in Africa, as already stated by others in West Africa [25].

With regard to hepatitis C, the rate found among DUs is more than 40 times higher than among the general Senegalese population (23.3% versus 0.49%) [15] and strongly linked to the practice of injection. The HCV prevalence of 38.8% in PWID is in line with that of the only study addressing the same issue and conducted in Ghana (40.1%) [9]. The HCV prevalence of 18% found in non-injecting DUs is also in line with other data [26], but it should be noted that this systematic review did not include data from sub-Saharan Africa. In developed countries, risk factors associated with HCV infection are age, injection [27] and more recently identified, crack consumption and unstable housing [17,28]. Those transmission routes that are also indicators of precariousness should therefore be explored in the context of developing countries and might partly explain the high rate of HCV infection in non-injectors.

Finally, the prevalence of HBs-Ag in the study was very similar to the prevalence of chronic hepatitis B in the Senegalese population. No risk factor associated with the use of drugs or to behavioural determinants has been identified. This is in line with the main route of transmission of HBV in sub-Saharan Africa being from mother to infant and during early childhood, therefore happening before the adult age.

The assessment of the level of knowledge among DUs regarding the determinants of HIV and HCV transmission was an essential component of this study. Most respondents had a good knowledge of HIV but not of HCV risk factors. A minority (13%) of DUs had shared needles in the past month, but 27 and 34% had shared water/filters and spoons, illustrating the fact that very few were aware of the risk of

HCV transmission through shared injection equipment. HIV transmission through sexual intercourse was well known; however, only 50% used condoms. Commercial sex (at least once for drugs or money) was reported by a quarter of respondents, illustrating the obvious link with precariousness and high vulnerability in women. Only a very small number of participants had had an HIV, HBV or HCV serology performed prior to the study (29, 4 and 4%, respectively), although most of them knew that they were particularly at risk of being infected. These data question the accessibility to HIV and HCV screening for DUs populations in West Africa, in the absence of specific prevention and care programmes and in a repressive legal and social context for DUs. The significantly higher rate of participants (41.5%) who came for their results compared to those who were not included in the study (13.4%) shows the mobilizing character of participation in the survey. However, the most vulnerable, namely women, less than 34.1 years and PWID were very few, underlining the need for specific care programmes to reach them.

Some study limitations should be highlighted. First, the survey explored a precarious population and did not reach DUs from higher social classes where cocaine use seems to be more frequently reported. Second, despite having selected female and young "seeds," the recruitment was very low among both groups. Our results may not be considered as fully representative of those two groups. Finally, we must take into account the methodological limitations related to the RDS approach. Indeed, although considered as the gold standard among methods for estimating the prevalence of infectious diseases among hidden populations, this method is relatively new and as such its robustness could not be fully compared to those based on random sampling. The study results should be considered rather as order of magnitude of the phenomenon and interpreted with caution.

More importantly, this study provided DUs with access to effective care and prevention through the field team and study staff. About 42% of participants came back to get their test results. Harm reduction activities were initiated during the study and continued thereafter through support from Expertise France Health Department, a bilateral French AIDS organization (www.expertisefrance.fr, last accessed 14 March 2015).

This study brings to light the significant vulnerability to HIV and HCV infection of non-injecting DUs living in developing countries. More studies are needed to better decipher the pathways to HCV infection in non-injecting DUs. Harm reduction programmes with access to substitution (including methadone) therapy are now required, and a response to the issues underlined by this study has been recently launched in Senegal: the DUs have been integrated as a vulnerable population in the National Strategic Plan in Response to AIDS (www.apf.francophonie.org/IMG/pdf/2013_10_vih_dakar_senegalstrategie.pdf, last accessed 14 February 2014) and fund raising has enabled the implementation of an integrated prevention and methadone programme for DUs in the Dakar area.

Authors' affiliations

¹Institut Médecine Épidémiologie Appliquée, Université Xavier Bichat, Paris, France; ²Hôpital Psychiatrique de Thiaroye, Dakar, Senegal; ³Sorbonne-Université, Paris, France; ⁴Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Universitaires

de l'Est Parisien, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; ⁵Inserm UMR-S1136, Institut Pierre-Louis de Santé Publique, Paris, France; ⁶Centre Régional de Recherche et de Formation à la Prise en Charge Clinique (CRFC), Service des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire de Fann, Dakar, Sénégal; ⁷Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Le Dantec, Dakar, Sénégal; ⁸Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; ⁹Département Santé, Expertise France, Paris, France

Competing interests

No competing interest has been reported by any authors.

Authors' contributions

All authors have designed the study, AL, IB, MM, AT, ON, CTK and JT have participated to the data collection, KI and AL have written the paper, all authors have revised and amended the paper.

References

- Mathers BM, Degenhardt L, Ali H, Wiessing L, Hickman M, Mattick RP, et al. HIV prevention, treatment, and care services for people who inject drugs: a systematic review of global, regional, and national coverage. *Lancet*. 2010;375:1014–28.
- UNODC. *World Drug Report 2013*. United Nations Publication, Sales No. E.13.XI.6 2013.
- Bowring AL, Luhmann N, Pont S, Debaullieu C, Derozier S, Asouab F, et al. An urgent need to scale-up injecting drug harm reduction services in Tanzania: prevalence of blood-borne viruses among drug users in Tembeke District, Dar-es-Salaam, 2011. *Int J Drug Policy*. 2013;24:78–81.
- Beyrer C, Malinowska-Sempruch K, Kamarulzaman A, Kazatchkine M, Sidibe M, Strathdee SA. Time to act: a call for comprehensive responses to HIV in people who use drugs. *Lancet*. 2010;376:551–63.
- Eliuwa GI, Strathdee SA, Adebayo SB, Ahonsi B, Adebajo SB. A profile on HIV prevalence and risk behaviors among injecting drug users in Nigeria: should we be alarmed? *Drug Alcohol Depend*. 2013;127:65–71.
- Fisher JC, Bang H, Kapiga SH. The association between HIV infection and alcohol use: a systematic review and meta-analysis of African studies. *Sex Transm Dis*. 2007;34:856–63.
- Shoptaw S, Montgomery B, Williams CT, El-Bassel N, Aramrattana A, Metsch L, et al. Not just the needle: the state of HIV-prevention science among substance users and future directions. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013; 63(Suppl 2):S174–8.
- Plankey MW, Ostrow DG, Stall R, Cox C, Li XH, Peck JA, et al. The relationship between methamphetamine and popper use and risk of HIV seroconversion in the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45: 85–92.
- Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*. 2011;378:571–83.
- Zeremski M, Makeyeva J, Arasteh K, Des Jarlais DC, Talal AH. Hepatitis C virus-specific immune responses in noninjecting drug users. *J Viral Hepat*. 2012;19:554–9.
- Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD) et ICF International. *Enquête Démographique et de Santé. Indicateurs Multiples au Sénégal (EDS-MICS) 2010–2011*. Calverton, MD: ANSD et ICF International; 2012.
- UNAIDS. *Global AIDS response progress reporting: monitoring the 2011 political declaration on HIV/AIDS: guidelines on construction of core indicators: 2012 reporting* [Internet]. 2012 [cited 2014 Jan 3]. Available from: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/document/2011/0C2215_Global_AIDS_Response_Progress_Reporting_en.pdf.
- Mathers BM, Degenhardt L, Phillips B, Wiessing L, Hickman M, Strathdee SA, et al. Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. *Lancet*. 2008;372:1733–45.
- Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:107–15.
- Diop S, Ndiaye M, Seck M, Chevalier B, Jambou R, Sarr A, et al. Prevention of transfusion transmitted malaria in endemic area. *Transfus Clin Biol*. 2009;16:454–9.
- Raguin G, Lepretre A, Ba I, Ndoye I, Toufik A, Brucker G, et al. Drug use and HIV in West Africa: a neglected epidemic. *Trop Med Int Health*. 2011;16: 1131–3.
- Jauffret-Roustide M, Le Strat Y, Couturier E, Thierry D, Roudy M, Quaglia M, et al. A national cross-sectional study among drug-users in France: epidemiology of HCV and highlight on practical and statistical aspects of the design. *BMC Infect Dis*. 2009;9:113.
- Broadhead RS, Heckathorn DD, Altice FL, van Hulst Y, Carbone M, Friedland GH, et al. Increasing drug users' adherence to HIV treatment: results of a peer-driven intervention feasibility study. *Soc Sci Med*. 2002;55:235–46.
- Heckathorn D. Extensions of respondent-driven sampling: analyzing continuous variables and controlling for differential recruitment. *Sociol Method*. 2007;37:151–207.
- Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD). *Situation Economique et Sociale au Sénégal en 2009*. Distribution: Division de la Documentation, de la Diffusion et des Relations avec les Usagers. ISSN 0850-1491; 2010. www.ansd.sn
- Reid SR. Injection drug use, unsafe medical injections, and HIV in Africa: a systematic review. *Harm Reduct J*. 2009;6:24.
- Addiction EMCFdD. *Annual report 2012: the state of the drugs problem in Europe*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2012.
- Ross MW, McCurdy SA, Kilonzo GP, Williams ML, Leshabari MT. Drug use careers and blood-borne pathogen risk behavior in male and female Tanzanian heroin injectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:338–43.
- Cleland CM, Jarlais DCD, Perlis TE, Stimson G, Pzenyak V, WHO Phase II Drug Injection Collaborative Study Group. HIV risk behaviors among female IDUs in developing and transitional countries. *BMC Public Health*. 2007;7:271.
- Koffi J. *Expérience du projet Corridor*. Oral Communication International Conference on AIDS and STI in Africa; 2008 Dec 3–7; Dakar, Sénégal; 2008.
- Scheinmann R, Hagan H, Lelutiu-Weinberger C, Stern R, Des Jarlais DC, Flom PL, et al. Non-injection drug use and hepatitis C virus: a systematic review. *Drug Alcohol Depend*. 2007;89:1–12.
- McMahon JM, Pouget ER, Tortu S. Individual and couple-level risk factors for hepatitis C infection among heterosexual drug users: a multilevel dyadic analysis. *J Infect Dis*. 2007;195:1572–81.
- Shannon K, Rusch M, Morgan R, Oleson M, Kerr T, Tyndall MW. HIV and HCV prevalence and gender-specific risk profiles of crack cocaine smokers and dual users of injection drugs. *Subst Use Misuse*. 2008;43:521–34.

Annexe 3 :



Journal of Medical Virology

Usefulness of Dried Blood Spots (DBS) to perform hepatitis C virus genotyping in drug users in Senegal

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID	JMV-15-4768.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ndiaye, Ousseynou; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, ; Centre Régional de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida-CHU Fann, Gozlan, Joel; Hôpital St Antoine, Diop-Ndiaye, Halimatou; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Sow-Sall, Amina; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Chapelain, Sophie; Hôpital St Antoine, Leprêtre, Annie; Institut de Médecine et Epidémiologie Appliquées-IMEA, Maynard, Maryvonne; Centre Régional de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida-CHU Fann, Gueye, Malle; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, LO, Gora; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Thiam, Moussa; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Ba, Idrissa; Service Psychiatrie-CHU Fann, Lacombe, K; Hôpital St Antoine, Girard, Pierre; Hôpital St Antoine, M'Boup, souleymane; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec, Kane, Coumba Toure; Université Cheikh Anta Diop Dakar, laboratoire de Bacteriologie-Virologie CHU A. Le Dantec,
Keywords:	HCV, Drug users , DBS, Senegal

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

1 **Title page: Usefulness of Dried Blood Spots (DBS) to perform hepatitis C virus**
2 **genotyping in drug users in Senegal**

3 **Authors:**

4 O. Ndiaye^{1,4}, J. Gozlan², H. Diop-Ndiaye¹, A.S. Sall¹, S. Chapelain², A. Leprêtre³, M.
5 Maynard⁴, M. Gueye¹, G Lo¹, M Thiam¹, I. Ba⁵, K. Lacombe¹, P.M. Girard², S Mboup¹,
6 C.T. Kane*¹

7 **Author affiliations:**

8 1: Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Laboratoire de Bactériologie-Virologie CHU
9 A. le Dantec, Dakar – Sénégal

10 2: Hôpital St Antoine, Paris, France

11 3: Institut de Médecine et Epidémiologie Appliquées-IMEA, Paris, France,

12 4: Centre Régional de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida-CHU Fann, Dakar,
13 Sénégal

14 5: Service Psychiatrie-CHU Fann, Dakar, Sénégal.

15 **Running title: DBS for HCV genotyping**

16 **Corresponding author:** Coumba Toure Kane, Université Cheikh Anta Diop, Dakar,
17 and Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, Dakar,
18 Sénégal,

19 Tél: (221) 33 821 64 20; fax: (221) 33 821 64 42,

20 Electronic address: ctourekane@yahoo.co.uk

21

22

23

27 **Abstract**

28 The aim of this pilot study was to analyze the Hepatitis C Virus (HCV) genotypes
29 circulating in Senegal among Drug User (DUs), using Dried Blood Spots (DBS) as
30 RNA source for molecular assays.

31 Heroin and/or cocaine users (n = 506) were recruited in Dakar from April to July
32 2011, using a Respondent Driven Sampling (RDS) method. DBS preparation
33 consisted of five drops of whole blood from finger applied to a Whatman paper card.
34 HCV infection was screened by the detection of anti-HCV antibodies, using a rapid
35 immune-chromatographic test. HCV RNA was quantified on anti-HCV positive DBS,
36 using the Abbott RealTime HCV[®] Genotyping was performed on DBS with detectable
37 viral load with Versant[®] HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) and Abbott RealTime HCV
38 Genotype II assay[®].

39 Among the 506 participants, 120 were tested as positive for anti-HCV antibodies and
40 their samples were analyzed for HCV RNA viral load and genotype. Out of the 120
41 DBS tested, HCV RNA was detected on 25 (20.8%). The median viral load was
42 15,058 IU/ml (ranging from 710 to 766,740 IU/ml). All positive DBS were suitable for
43 the genotyping assay, that showed a predominance of genotype 1 (21/25) including
44 16 genotypes 1a and 5 genotypes 1b.

45 HCV genotype 1 prevails in a DU population in Dakar. DBS could be useful for HCV
46 RNA genotyping, but optimal storage conditions should required avoiding RNA
47 impairment. Acknowledging this limitation, DBS could be a great interest for detecting
48 and genotyping HCV viremic patients.

49

53 Introduction

54 Hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem, with an estimated 170
55 million people persistently infected worldwide at varying levels between countries
56 [Saleha et al., 2014; Hope et al., 2014]. In Sub-Saharan Africa, prevalence was
57 estimated at 3% including 2.4% in West Africa [Madhava et al., 2002]. Central/East
58 Asia and North/Middle East Africa showed the highest prevalence estimated at over
59 3.5% [Mohd Hanafiah et al., 2013] with a particularity of Egypt where the highest
60 prevalence recorded in the world was estimated nationwide at 14.7% [Mohamoud et
61 al., 2013].

62 Major cause of liver disease, HCV chronic infection can lead to cirrhosis and
63 hepatocellular carcinoma HCV, and is a potential cause of substantial morbidity and
64 mortality worldwide [Alter, 2007; Shepard et al., 2005]. Follow up of patients
65 chronically infected with HCV requires a virological monitoring, which includes viral
66 load and genotype determination, in order to select the optimal therapy. Until
67 recently, treatment was mostly depending on viral genotype and level of fibrosis.
68 HCV includes six major genotypes and several subtypes unequally distributed around
69 the world [Zein, 2000; Saleha et al., 2014]. Notable differences, related to
70 genotypes, are observed on the sustained virological response (SVR) after
71 pegylated-interferon/ ribavirin therapy [Fried et al., 2002], as well as new therapeutic
72 combinations using direct antiviral agents (AAD) such as anti-protease NS3-4A and
73 anti-polymerase NS5B [Pawlotsky, 2014].

74 Viral load and genotyping assays based on gene amplification are difficult to set up in
75 resources limited settings, which is partly due to the need of optimal sample
76 processing, storage and shipment from the collection site to the reference laboratory.
77 These requirements are challenging mostly in key populations such as drug users

78 (DUs), because of poor feasibility of venipuncture. Capillary blood collected on DBS,
79 already used for epidemiological surveys and monitoring for many infectious agents,
80 could be a good alternative for the determination of HCV viral load and genotypes in
81 this vulnerable group.

82 Prevalence of HCV is very high among DUs group, reaching 22 to 94% in some
83 studies [Fadlalla et al., 2015]. A recent study in Senegal, showed a prevalence of
84 23.3% for anti-HCV antibodies [Leprêtre et al., 2015], which is very high comparing
85 to HIV-positive patients (1.6%) [Diop-Ndiaye et al., 2008] or blood donors (1.4%)
86 [Dieye et al., 2006]. However, few data on HCV is available in the country and
87 especially on circulating genotypes and there is a real need to make an update. The
88 aim of this pilot study was to determine the circulating HCV genotypes among DUs in
89 Senegal using DBS samples as RNA source for molecular assays.

90 **Material and methods**

91 **Sample collection**

92 The participants were selected among DUs from the UDSEN survey (Drug Users in
93 Senegal: ANRS 12243 project), a cohort recruited using the Responding Driven
94 Sampling (RDS) method [Burt and Thiede, 2014]. For each participant, DBS were
95 prepared from fingerpick on Whatman 903[®] (Whatman GmbH, Dassel, Germany).
96 DBS were then dried at least 3 hours at room temperature and kept at 4°C for 2
97 weeks before being frozen at -80°C.

98 **Serological test:**

99 For each DBS card, two spots of 8 mm² were cut and were incubated over night at
100 4°C with 400 µl of PBS buffer. DBS eluates were used for HIV, HBV and HCV test
101 using rapid immuno-chromatographic assays according to manufacturer's
102 instructions. Briefly HIV testing was performed with HIV-1/2 Determine[®]Ag/Ab Combo

78 (DUs), because of poor feasibility of venipuncture. Capillary blood collected on DBS,
79 already used for epidemiological surveys and monitoring for many infectious agents,
80 could be a good alternative for the determination of HCV viral load and genotypes in
81 this vulnerable group.

82 Prevalence of HCV is very high among DUs group, reaching 22 to 94% in some
83 studies [Fadlalla et al., 2015]. A recent study in Senegal, showed a prevalence of
84 23.3% for anti-HCV antibodies [Leprêtre et al., 2015], which is very high comparing
85 to HIV-positive patients (1.6%) [Diop-Ndiaye et al., 2008] or blood donors (1.4%)
86 [Dieye et al., 2006]. However, few data on HCV is available in the country and
87 especially on circulating genotypes and there is a real need to make an update. The
88 aim of this pilot study was to determine the circulating HCV genotypes among DUs in
89 Senegal using DBS samples as RNA source for molecular assays.

90 **Material and methods**

91 **Sample collection**

92 The participants were selected among DUs from the UDSEN survey (Drug Users in
93 Senegal: ANRS 12243 project), a cohort recruited using the Responding Driven
94 Sampling (RDS) method [Burt and Thiede, 2014]. For each participant, DBS were
95 prepared from fingerpick on Whatman 903[®] (Whatman GmbH, Dassel, Germany).
96 DBS were then dried at least 3 hours at room temperature and kept at 4°C for 2
97 weeks before being frozen at -80°C.

98 **Serological test:**

99 For each DBS card, two spots of 8 mm² were cut and were incubated over night at
100 4°C with 400 µl of PBS buffer. DBS eluates were used for HIV, HBV and HCV test
101 using rapid immuno-chromatographic assays according to manufacturer's
102 instructions. Briefly HIV testing was performed with HIV-1/2 Determine[®]Ag/Ab Combo

103 kit (Matsudo-shi Medical Co. Alere, Matsuhidai, Chiba, Japan) and HIV positivity was
104 confirmed with ImmunoComb® II HIV1 & 2 BiSpot kit (Organics, Yavne, Israel). HBV
105 serology was performed with HEP-CHECK-1kit (VEDA LAB, Alencon, France) and
106 HCV serology with VEDALAB-HCV-CHECK-1® kit (VEDA LAB, Alencon, France).

107 **HCV viral load quantification**

108 HCV viral load was quantified on all DBS positive for anti-HCV antibodies, using the
109 Abbott RealTime HCV® assay (Abbott, Wiesbaden, Germany) according to
110 manufacturer's instructions. Nucleic acids were eluted from DBS by stirring two spots
111 of 50 µl in 2.5 ml of the Abbott lysis buffer [Chevaliez et al., 2009]. Viral RNA was
112 extracted from 1 ml of this buffer (in the M2000sp extractor), then reverse-transcribed
113 and amplified in the 5' NC region of the HCV genome (in the M2000rt thermal cyclor).
114 Specific probes were used to quantify both viral target region and internal control in
115 each sample. The assay dynamic range is 1.08 to 8.0 log₁₀ UI/ml. **Viral load from**
116 **DBS were multiplied by 10 to obtain the final results as Abbott HCV plasma viral load**
117 **is performed using 1000 µl.**

118 **Versant® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)**

119 Genotyping was performed for all samples with detectable HCV viral RNA, using
120 Versant® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,
121 Tarrytown, USA). The Versant LiPA is based on a reverse hybridization of
122 biotinylated DNA PCR products generated by RT-PCR amplification of the 5,UTR
123 and Core region of HCV genome. Then, amplicons were hybridized to immobilize
124 oligonucleotide probes that are specific to the 5' UTRs and core regions of the six
125 HCV genotypes [Verbeeck et al., 2008]. Versant HCV genotype assay was
126 performed on 10 µl of the previously extracted RNA with the m2000sp automate.

127 according to manufacturer's instructions. The lower limit of detection indicated by the
128 manufacturer is 2,176 IU/ml.

129 **Abbott Genotyping assay**

130 Abbott genotyping was performed for a subset of 12 samples with a remaining
131 volume above 1000 µl. Abbott RealTime HCV Genotype II assay[®] (Abbott Molecular
132 Inc., Abbott Park, USA) used 4 pairs of PCR primers including the primer pair of IC
133 (Internal Control) to detect HCV group 1 to 6 [Shinol et al., 2012]. Extraction
134 (m2000sp extractor) and amplification of nucleic acid (m2000rt thermal cycler) were
135 performed according to manufacturer's instructions and the lower limit detection was
136 500 IU/ml.

137 **Results**

138 **Participant socio demographic and serological characteristics**

139 Among 506 DUs participants, 120 (23.7%) had positive anti-HCV antibodies, among
140 whom, 13 (10.8%) were co-infected with HIV-1 and 12 (10%) with HBV. They were
141 predominantly men (83.3%) with a median age of 43 years old (ranging from 18 to
142 88). Among HCV positive DUs, 55 (45.8%) reported a passed intravenous use of
143 heroin and/or cocaine, with a last injection occurred less than 6 months for 41
144 participants (34%) and less than 1 month for 34 (28.3%).

145 **HCV viral load determination and genotyping**

146 Out of the 120 DBS tested, only 25 had detectable viral load (20.8%) with a median
147 value of 15,058 IU/ml (from 710 to 766,740 IU/ml). All detectable viral load was
148 successfully genotyped using Versant[®] HCV genotype and genotypes were
149 distributed as described in table 1. Genotype 1 was predominant and included 18
150 genotypes 1a and 5 genotypes 1b. Twelve samples were also tested by Abbott
151 genotyping kit and showed 100% concordance with Versant[®] HCV genotype assay

152 for the major subtypes detected. In addition, Abbott technologies had detected one
153 case of dual infection associating genotypes 1a and 1b.

154 Discussion

155 Standard HCV diagnostic assay used plasma specimens for anti-HCV detection and
156 RNA quantification. DBS, as alternative to plasma/serum has been used for
157 qualitative and quantitative detection of a wide variety of pathogens [Johannessen
158 et al., 2009]. Recently, some studies showed that DBS has potential for HCV RNA
159 detection, quantification and genotyping [Tuillon et al., 2010 ; Bennett et al., 2012]
160 and DBS is likely sufficient to detect and quantify HCV RNA for the purpose of HCV
161 diagnosis [Greenman et al., 2015].

162 Determination of HCV Viral Load

163 Using a sensitive RT-PCR assay, HCV RNA was detected in 20.5 % of the HCV
164 antibodies positive DBS. The proportion of undetectable viral load among HCV
165 positive DBS was surprising, considering the usual rate of spontaneous recovery,
166 estimated in Western countries between 15 and 40% [Seeff, 2002]. Higher rates of
167 spontaneous HCV clearance have been previously reported, notably in West Africa
168 [Candotti et al., 2003], but they remain lower than the high frequency observed from
169 our DBS. Undetectable viral load could also be related to the fact that DBS should be
170 stored short time after drying to at least -20°C to avoid RNA degradation six days
171 later [Tuillon et al., 2010]. Similarly, a reduction of HCV viral load using dried serum
172 specimens stored at room temperature for 4 weeks was also reported [Abe and
173 Konomi, 1998]. In contrast, others studies had reported no significant variation in the
174 stability of HCV RNA in DBS over a period of 12 months, irrespective of different
175 storage temperatures [Bennett et al., 2012]. Salomone M et al. found that DBS,
176 stored at room temperature over an 11 month period, remained suitable for HCV

177 RNA detection and are also useful for HCV genotyping [Salomone et al., 2002].
178 However, Bennett S et al. and Salomone M et al. amplified HCV RNA from DBS
179 using an in-house nested PCR. The use of commercial kits for the extraction and
180 amplification method has several advantages: the expertise for assay development
181 and optimization is not required, and quality control can use the manufacturer's
182 control reagents [Tuailon et al., 2010].

183 In our study, to avoid multiple congelation/decongelation cycles of the DBS during
184 the serological tests, we decided to keep them at 4° for up to 2 weeks before storage
185 at - 80°C but this strategy could have been deleterious for the upcoming molecular
186 analysis. Therefore, DBS need to be stored at least - 20°C just after the drying step
187 to avoid the dramatic RNA degradation but further optimization studies under
188 different storage conditions will be helpful in the perspective of both HCV genotyping
189 and treatment monitoring. However, we cannot exclude that the small percentage of
190 HCV detected was related to some false serology results because only one anti-HCV
191 test was performed.

192 HCV Genetic diversity

193 Genotyping was performed by Versant® HCV genotype assay on 25 DBS and
194 genotypes 1a and 1b are predominant with a rate of 84%. Similar results were found
195 in United States with the predominance of genotypes 1a and 1b either in the general
196 population or in the DUs group [Blatt et al., 2000; Dias et al., 2011; Lau et al.,
197 1996]. HCV subtypes 1a and 3a were also the predominant genotypes among IDUs
198 in Europe [Bourliere et al., 2002; van Asten et al., 2004; Payan et al., 2005] but
199 knowledge about HCV genetic diversity is lacking in this population in Africa. In other
200 West African countries, genotype 2 was predominant particularly in Guinea-Bissau
201 among general population aged \geq 50 years (98.25%) while genotype 1 represent only

202 1 case [Plamondon et al., 2007] and in Ghana, genotype 2 (87%) and genotype 1
203 (13%) had found in blood donors [Candotti et al., 2003]. In Cameroon, genotype 1
204 and 4 were more frequent [Njouom et al., 2008; Pasquier et al., 2005] and in North
205 Africa, particularly in Egypt, genotype 4 was the predominant one [Elkady et al.,
206 2009]. Although the size of our sample population is limited, this discrepancy
207 suggests that HCV genotypes circulating in West Africa is different according the
208 specific country or population that are analyzed

209 Genotyping was also realized with Abbott HCV Genotype II[®] on 12 samples already
210 tested by Versant[®] HCV genotype with a good concordance between techniques.
211 However, Abbott assay seems to be more sensitive with a case of genotype 1a+1b
212 dual infection. Similar results were reported by Liu et al. comparing Abbott and LiPA
213 with a concordance rates greater than 99% and one patient with a mixed genotype
214 1a+1b infection [Liu et al., 2015].

215 **Conclusion**

216 Despite the small number of samples, this study gave for the first time information on
217 HCV genotypes circulating in a DUs group in Senegal. These data are important to
218 collect for future access to anti-HCV therapies in resources-limited settings and/or in
219 vulnerable populations program. However, the predominance of genotype 1 in this
220 DUs group in Senegal must be confirmed by larger studies which will include more
221 patients. From this prospect, DBS could be very useful in resources-limited settings,
222 for both HCV genotyping and treatment monitoring acknowledging the critical
223 importance of DBS's storage conditions.

224 **Acknowledgment**

225 We would like to express our thanks to: the survey participants for their availability,
226 the team members who realized the survey, ANRS which funded the project. The

227 French Cooperation which granted a scholarship and ASLM for supporting this
228 writing.

229 **Conflict of interest**

230 The authors declare no conflicts of interest

231 **List of table:**

232 Table 1: HCV RNA and genotypes from DBS

233

234 **Reference:**

235

236 **Abe K, Konomi N.** 1998. Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter
237 paper is stable at room temperature. *J Clin Microbiol* **36**:3070-2.

238 **Alter MJ.** 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*
239 **13**:2436-2441.

240 **Blatt LM, Mutchnick MG, Tong MJ, Klion FM, Lebovics E, Freilich B, Bach N,**
241 **Smith C, Herrera J, Tobias H, Conrad A, Schmid P, McHutchison JG.** 2000.
242 Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with
243 chronic hepatitis C in the United States. *J Viral Hepat* **7**:198-202.

244 **Bennett S, Gunson RN, McAllister GE, Hutchinson SJ, Goldberg DJ, Cameron**
245 **SO, Carman WF.** 2012 Detection of hepatitis C virus RNA in dried blood spots.
246 *J Clin Virol* **54**:106-9.

247 **Bourliere M, Barberin JM, Rotily M, Guagliardo V, Portal I, Lecomte L, Benali S,**
248 **Boustiere C, Perrier H, Jullien M, Lambot G, Loyer R, LeBars O, Daniel R,**
249 **Khiri H, Halfon P.** 2002. Epidemiological changes in hepatitis C virus
250 genotypes in France: evidence in intravenous drug users. *J Viral Hepat* **9**:62-70.

- 251 **Burt RD, Thiede H.** 2014. Assessing differences in groups randomized by
252 recruitment chain in a respondent-driven sample of Seattle-area injection drug
253 users. *Ann Epidemiol* **24**:861-867.
- 254 **Candotti D, Temple J, Sarkodie F, Allain JP.** 2003. Frequent recovery and broad
255 genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West
256 Africa. *J Virol* **77**:7914-7923.
- 257 **Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM.** 2009. Performance of the Abbott
258 real-time PCR assay using m2000sp and m2000rt for hepatitis C virus RNA
259 quantification. *J Clin Microbiol* **47**:1726-32.
- 260 **Dias PT, Hahn JA, Delwart E, Edlin B, Martin J, Lum P, Evans J, Kral A, Deeks
261 S, Busch MP, Page K.** 2011. Temporal changes in HCV genotype distribution
262 in three different high risk populations in San Francisco, California. *BMC Infect
263 Dis* **11**:208.
- 264 **Dieye TN, Gadji M, Cisse Y, Diallo TA, Toure Falla O, Diop S, Diallo S, Thiam D,
265 Diakhate L.** 2008. Seroprevalence of hepatitis C virus (HCV) in Senegalese
266 blood donors. *Dakar Med* **51**:47-52.
- 267 **Diop-Ndiaye H, Touré-Kane C, Etard JF, Lô G, Diaw P, Ngom-Gueye NF, Gueye
268 PM, Ba-Fall K, Ndiaye I, Sow PS, Delaporte E, Mboup S.** 2008. Hepatitis B, C
269 seroprevalence and delta viruses in HIV-1 Senegalese patients at HAART
270 initiation (retrospective study). *J Med Virol* **80**:1332-6.
- 271 **Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Sugiyama M, Khan A, Sayed D,
272 Moustafa G, Abdel-Hameed AR, Mizokami M.** 2009. Genetic variability of
273 hepatitis C virus in South Egypt and its possible clinical implication. *J Med Virol*
274 **81**:1015-1023.

- 275 **Fadlalla FA, Mohamoud YA, Mumtaz GR, Abu-Raddad LJ.** 2015. The
276 epidemiology of hepatitis C virus in the maghreb region: systematic review and
277 meta-analyses. *PLoS One* **10**:e0121873.
- 278 **Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr,**
279 **Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J,**
280 **Yu J.** 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus
281 infection. *N Engl J Med* **347**:975-982.
- 282 **Greenman J, Roberts T, Cohn J, Messac L.** 2015. Dried blood spot in the
283 genotyping, quantification and storage of HCV RNA: a systematic literature
284 review. *J Viral Hepat* **22**:353-61.
- 285 **Hope VD, Eramova I, Capurro D, Donoghoe MC.** 2014 Prevalence and estimation
286 of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data
287 focusing on the countries outside the European Union and the European Free
288 Trade Association. *Epidemiol Infect* **142**:270-86.
- 289 **Johannessen A, Trøseid M, Calmy A.** 2009. Dried blood spots can expand access
290 to virological monitoring of HIV treatment in resource-limited settings. *J*
291 *Antimicrob Chemother* **64**:1126-9
- 292 **Lau JY, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M,**
293 **Simmonds P.** 1996. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by
294 line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral
295 centers in the United States. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern*
296 *Med* **124**:868-876.
- 297 **Leprêtre A, Ba I, Lacombe K, Maynard M, Toufik A, Ndiaye O, Kane CT, Gozlan**
298 **J, Tine J, Ndiaye I, Raguin G, Girard PM.** 2015. Prevalence and behavioural

- 299 risks for HIV and HCV infections in a population of drug users of Dakar,
300 Senegal: the ANRS 12243 UDSEN study. *J Int AIDS Soc* 18:19888.
- 301 **Liu CH, Liang CC, Liu CJ, Lin CL, Su TH, Yang HC, Chen PJ, Chen DS, Kao JH.**
302 2015. Comparison of Abbott RealTime HCV Genotype II with Versant Line
303 Probe Assay 2.0 for Hepatitis C Virus Genotyping. *J Clin Microbiol* 53: 1754-
304 1757.
- 305 **Madhava V, Burgess C, Drucker E.** 2002. Epidemiology of chronic hepatitis C virus
306 infection in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 2:293-302.
- 307 **Mohamoud YA., Mumtaz GR, Riome S, Miller D, Abu-Raddad LJ.** 2013. The
308 epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data
309 synthesis. *BMC Infect Dis* 13:288.
- 310 **Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST.** 2013. Global
311 epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific
312 antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57:1333-1342.
- 313 **Njouom R, Sartre MT, Timba I, Nerrienet E, Tchendjou P, Pasquier C, Rousset**
314 **D.** 2008. Efficacy and safety of peginterferon alpha-2a/ribavirin in treatment-
315 naive Cameroonian patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 80: 2079-
316 2085.
- 317 **Pasquier C, Njouom R, Ayouba A, Dubois M, Sartre MT, Vessiere A, Timba I,**
318 **Thonnon J, Izopet J, Nerrienet E.** 2005. Distribution and heterogeneity of
319 hepatitis C genotypes in hepatitis patients in Cameroon. *J Med Virol* 77:390-
320 398.
- 321 **Pawlotsky JM.** 2014. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and
322 challenges. *Gastroenterology* 146:1176-92.

- 323 **Payan C., Roudot-Thoraval F., Marcellin P., Bled N., Duverlie G., Fouchard-Hubert I.,**
324 **Trimoulet P., Couzigou P., Cointe D., Chaput C., Henquell C., Abergel A.,**
325 **Pawlotsky J.M., Hezode C., Coude M., Bianchi A., Alain S., Loustaud-Ratti V.,**
326 **Chevallier P., Trepo C., Gerolami V., Portal I., Halfon P., Bourliere M., Bogard**
327 **M., Plouvier E., Laffont C., Agius G., Silvain C., Brodard V., Thieffin G., Buffet-**
328 **Janvresse C., Riachi G., Grattard F., Bourlet T., Stoll-Keller F., Doffoel M.,**
329 **Izopet J., Barange K., Martinot-Pelgnoux M., Branger M., Rosenberg A., Sogni**
330 **P., Chalx M.L., Pol S., Thibault V., Opolon P., Charrois A., Serfaty L.,**
331 **Fouqueray B., Grange J.D., Lefrere J.J., Lunel-Fabiani F.** 2005. Changing of
332 hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third
333 millenium: The GEMHEP GenoCII Study. *Journal of viral hepatitis* 12: 405-413.
- 334 **Plamondon M, Labbe AC, Frost E, Deslandes S, Alves AC, Bastien N, Pepin J.**
335 2007. Hepatitis C virus infection in Guinea-Bissau: a sexually transmitted
336 genotype 2 with parenteral amplification? *PLoS One* 2:e372.
- 337 **Shinol RC, Gale HB, Kan VL.** 2012. Performance of the Abbott RealTime HCV
338 Genotype II RUO assay. *J Clin Microbiol* 50:3099-101.
- 339 **Solmone M, Girardi E, Costa F, Pucillo L, Ippolito G, Capobianchi MR.** 2002.
340 Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus
341 RNA in dried blood spots stored at room temperature. *J Clin Microbiol* 40:3512-
342 4.

- 343 **Saleha S, Kamal A, Ullah F, Khan N, Mahmood A, Khan S.** 2014. Prevalence of
344 hepatitis C virus genotypes in district bannu, khyber pakhtunkhwa, pakistan.
345 *Hepat Res Treat.* **2014**:165826.
- 346 **Seeff LB.** 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* **36**:S35-48.
- 347 **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus
348 infection. *Lancet Infect Dis* **5**:558-567.
- 349 **Tuailion E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, Van de
350 Perre P, Ducos J.** 2010. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and
351 molecular testing. *Hepatology* **51**:752-758.
- 352 **van Asten L, Verhaest I, Lamzira S, Hernandez-Aguado I, Zangerle R, Boufassa
353 F, Rezza G, Broers B, Robertson JR, Brettle RP, McMenamin J, Prins M,
354 Cochrane A, Simmonds P, Coutinho RA, Bruisten S.** 2004. Spread of
355 hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a
356 phylogenetic analysis. *J Infect Dis* **189**:292-302.
- 357 **Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, Morimoto J,
358 Farior A, Sablon E, Jankowski-Hennig M, Schaper C, Johnson P, Van
359 Ranst M, Van Brussel M.** 2008. Evaluation of Versant hepatitis C virus
360 genotype assay (LIPA) 2.0. *J Clin Microbiol* **46**:1901-1906.
- 361 **Zein NN.** 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* **13**:223-
362 35.
- 363 **Zein NN¹.** 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin*
364 **Microbiol Rev.** **13**: 223-35.
- 365
366
367
368

Table 1: HCV RNA and genotypes from DBS

ID Number	HIV	HBV	HCV viral load (UI/ml)	Inno LIPA genotype	Abbott genotype
1112112453	-	-	710	1b	-
1112112471	+	-	2780	1a	-
1112112464	-	+	3280	1b	-
1112418205	-	-	9340	1b	1b
1112418204	-	-	16180	1b	-
1112112492	-	-	34380	4acd	4
1112112537	-	-	43440	1a	1a
1112112525	-	-	45440	1b	1b
1112112498	-	-	66730	1a	1a
1112418115	+	-	73600	1b	-
1112418094	+	-	129510	1a	-
1112418183	-	-	130000	1a	-
1112112459	+	-	150580	1a	1a
1112418200	+	-	179090	1a	1a
1112418216	+	-	181800	1a	1a
1112418210	-	-	257110	4	-
1112418231	-	-	257110	1a	-
1112418104*	-	-	260000	1a	1a+1b
1112418179	-	-	270000	1a	1a
1112112466	-	-	277230	1a	-
1112418233	-	-	334700	1a	-
1112418192	+	-	400000	1a	1a
1112418208	-	-	442330	2ac	-
1112418185	-	-	500000	3a	3
1113028516	-	-	766740	1a	-

* Sample with dual infection 1a + 1b

RNA versus DNA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 versus Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5) for Early Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants in Senegal[†]

K. Kébé, O. Ndiaye, H. Diop Ndiaye, P. Mbakob Mengué, P. M. M. Guindo, S. Diallo, N. Léye, S. B. Gueye, A. Gaye Diallo, C. Touré Kane,* and S. Mboup

Laboratoire de Bactériologie Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

Received 26 November 2010/Returned for modification 15 February 2011/Accepted 1 April 2011

The objective of this study was to compare the performance of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 platform (bioMérieux, France) to the Amplicor HIV-1 DNA test v1.5 (Roche Molecular Systems, Switzerland) in detecting HIV-1 infection in infants using venipuncture-derived whole blood in tubes and dried blood spots. A total of 149 dried blood spots and 43 EDTA-anticoagulated peripheral blood samples were collected throughout Dakar and other areas in Senegal from infants and children aged 3 weeks to 24 months who were born to HIV-1-infected mothers. Samples were tested using the NucliSENS and Amplicor technologies. The NucliSENS and Amplicor results were 100% concordant using either EDTA-anticoagulated peripheral blood or dried blood spots. Compared to Amplicor, the sensitivity and specificity of the NucliSENS test were 100%. The NucliSENS EasyQ HIV-1 RNA assay performed as well as the Amplicor HIV-1 DNA test in detecting HIV-1 infection in infants. In addition, this platform can give an indication of the viral load baseline. The NucliSENS EasyQ platform is a good alternative for early infant diagnosis of HIV-1 infection.

In 2009, the number of sub-Saharan children infected by the human immunodeficiency virus (HIV) was estimated to be 2.3 million (30). Mother-to-child transmission is the most significant cause of HIV-1 infection and mortality in children under 15 years of age, especially during the first 24 months of life (25), creating an urgent need for early management of these children. Recent studies describing the management and care of newborns infected with HIV have shown that antiretroviral therapy should be implemented during the first 3 months of life (31). This can only be achieved by neonatal screening for HIV infection. However, accessibility can be a limiting factor because commonly available serological tests cannot be used with newborns due to the persistence of maternal antibodies until the age of 18 months (18). The diagnosis is therefore based on other tests, such as viral culture (12), P24 antigenemia, and detection of virus genetic material (26). Viral culture requires specific biosafety equipment, is highly time-consuming, and has low sensitivity (3, 6, 18). P24 antigen detection has lower sensitivity than molecular biology techniques (14), and the P24 antigen may pass through the placental barrier and be detected in noninfected newborns (20). These constraints led to the use of molecular biology techniques to diagnose HIV infection in newborns. The amplification of proviral DNA remains the reference technique for the neonatal diagnosis of HIV infection (7). This test can be performed within 48 h, whereas viral culture can take 14 to 28 days. The Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5, developed by Roche Laboratories, is recommended for the identification of HIV-1 infection in children under 18 months of age. It is the only technique that has been validated

in several studies in Africa and is widely used in North America, Europe, and Asia (1, 2, 4, 23, 32).

The use of dried blood spots (DBS) has been proposed since the 1990s to make neonatal diagnosis accessible to rural zones that are often far away from reference centers (1, 2, 4, 27). DBS are easy to obtain and are a convenient method for collecting and transporting blood samples because they have less restrictive transport requirements than whole blood in tubes. Several techniques for detecting proviral DNA use DBS for early infant HIV-1 diagnosis (11, 13, 15, 23, 29). Some have been developed in-house, while others are commercial, such as the validated Amplicor technique, which has sensitivity on DBS of 98.2 to 100% and a specificity of 98.6 to 100% (15, 16, 23). The high sensitivity of plasma HIV RNA quantification techniques now allows their substitution for DNA PCR tests (10, 22, 28). These techniques could be used also for early infant diagnosis (EID) because most infected children in these areas do not have the opportunity to be diagnosed before the age of 18 months.

As part of the Prevention of Mother to Child Transmission (PMTCT) initiative in Senegal, EID was first performed in a pilot phase in 2000 using a qualitative in-house PCR method. In 2007, the Amplicor test was introduced and also used DBS.

The widespread availability of RNA techniques in Senegal, as in other countries, and the validation of RNA quantitation on DBS (8, 9, 19) offered an opportunity to evaluate its use in EID.

The objective of the present study was to evaluate the performance of viral RNA detection with the NucliSENS system versus the reference technology, Amplicor, which detects proviral DNA and improves EID in Senegal. Early HIV testing can help HIV-infected infants access treatment, provide reassurance for families of uninfected infants, and help PMTCT programs monitor their effectiveness.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, 30 Avenue Pasteur, BP 7325, Dakar, Senegal. Phone: 221 33 8225919. Fax: 221 33 821 38 25. E-mail: ctourekane@yahoo.co.uk.

[†] Published ahead of print on 4 May 2011.

MATERIALS AND METHODS

Patients. In total, 192 blood samples were collected from 101 children born to HIV-1-infected mothers. Of these, 99 children were in the PMTCT program and aged from 3 weeks to 18 months and 2 were 24-month-old infants with repeated indeterminate HIV serology. Two types of samples were collected: whole blood in EDTA tubes and DBS. Venous blood samples ($n = 43$) were collected at Albert Royer, the children's reference hospital, and DBS ($n = 149$) were collected at PMTCT sites in the suburbs of Dakar and three other cities in Senegal (Mbour, Jolof, and Thiès).

Venipuncture blood sample processing. Blood samples were collected in EDTA tubes by venous puncture and transported daily to the reference laboratory within 6 h of collection. They were then centrifuged at 2,500 rpm for 10 min, and the buffy coat was separated from the plasma and stored at -20°C , while plasma samples were stored at -80°C .

Preparation of DBS. DBS were prepared by spotting several drops of blood collected from the heel or big toe of the child onto Whatman 903 filter paper. The preprinted circles were completely filled. After air-drying overnight at room temperature (22 to 37°C), the Whatman filter papers were stored in plastic zipper bags with a silica desiccant and a humidity indicator. The bags were sent in an envelope to the reference laboratory, where they were kept at room temperature (22 to 25°C) until tested. The median storage duration was 37 days.

DNA Amplification testing. The Roche Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5 is a qualitative *in vitro* test for the detection of HIV-1 DNA in whole blood (17). The test utilizes amplification of target DNA by the PCR and nucleic acid hybridization for the detection of HIV-1 DNA in human whole blood. Both types of specimens (buffy coat and DBS) can be used in this platform. The Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5 is based on four major processes: (i) sample preparation, (ii) PCR amplification of target DNA using HIV-1-specific complementary primers, (iii) hybridization of the amplified products to target-specific oligonucleotide probes, and (iv) colorimetric detection of the probe-bound amplified products. For both specimen types, the blood is washed (the DBS is cut out before handling) to collect the leukocytes by centrifugation for 15 min with detergent and proteinase K at 60°C for 30 min and at 100°C for 30 min. Then, a target 155-bp region of the *pol* gene is amplified. The Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5 permits simultaneous PCR amplification of HIV-1 target and internal control (IC) DNA. The Master Mix reagent contains a biotinylated primer pair specific for both HIV-1 and IC DNA. The detection of amplified DNA is performed using target-specific oligonucleotide probes that permit the independent identification of the HIV-1 IC amplification, which is performed at the user's option.

For a valid run, sample results were interpreted as follows. If the HIV-1 A_{450} result was <0.2 and the IC A_{450} result was ≥ 0.2 , HIV-1 DNA was not detected, and the sample was presumed negative for HIV-1 DNA. If the HIV-1 A_{450} result was <0.2 and the IC A_{450} result was <0.2 , the sample was considered inhibitory. HIV-1 DNA, if present, would not be detectable. Another aliquot of the original sample was processed, and the test was repeated. If the HIV-1 A_{450} result was ≥ 0.8 and the IC A_{450} result had any value, HIV-1 DNA was detected, and the sample was positive for the presence of HIV-1 DNA. Finally, if the HIV-1 A_{450} result was between 0.2 and 0.8 with any IC A_{450} value, the results seemed inconclusive for HIV-1 DNA. Repeat testing in duplicate was performed regardless of the IC result.

NucliSENS EasyQ HIV-1. This technique also targets the *pol* sequence and allows the quantification of HIV-1 and some HIV-2 subtypes in a range of 25 to 1,000,000 RNA copies in 1 ml of plasma (21). As with Amplicor, both types of specimen collection can be used with the NucliSENS platform. HIV-1 RNA extraction was performed with NucliSENS miniMAG using Boom technology with magnetic silica.

For DBS, one blood spot was completely excised using sterilized scissors that were swabbed with 0.1% bleach solution and dried between samples. The spot was placed in 2 ml of lysis buffer containing guanidine thiocyanate and Triton X-100 (bioMérieux, 130n, France) and gently rocked for 30 min at room temperature. The filter paper was then removed from the tube, and the solution containing the extracted nucleic acids was further processed. Under high-salt conditions, nucleic acids bind to the silica particles. These silica particles act as a solid phase, and non-nucleic acid components are removed by several washing steps performed in NucliSENS miniMAG. Finally, the nucleic acids are eluted from the solid phase.

In the case of EDTA-anticoagulated peripheral blood, 50 μl of plasma was processed according to the manufacturer's instructions in 2 ml of lysis buffer. The extraction was performed manually using the NucliSENS isolation kit according to the manufacturer's instructions. A synthetic calibrator of known HIV-1 concentration was added as an internal standard. The RNA extraction was followed by a nucleic acid sequence-based amplification and real-time detection with the

TABLE 1. Sensitivity and specificity of the NucliSENS test on venipuncture derived blood and DBS

Amplifier result	NucliSENS result (no. of samples) using:					
	Venipuncture-derived blood			DBS		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Positive	10	0	10	19	0	19
Negative	0	33	33	0	130	130
Total	10	33	43	19	130	149

NucliSENS EasyQ analyzer (bioMérieux) using 5 μl of the eluate according to the manufacturer's instructions.

Results were validated for each sample according to the amplification of the internal control.

Statistical analysis. To evaluate the performance of the NucliSENS EasyQ platform, the Amplicor test was used as a reference. Statistical analyses were performed using EPI INFO version 6 and Microsoft Excel 2003 software. The confidence intervals were 95% (95% CIs) and were calculated by using a normal distribution. The diagnostic accuracy of the NucliSENS EasyQ assay was assessed using the sensitivity (the number of true positives/[true positives + false negatives]), specificity (the number of true negatives/[true negatives + false positives]), positive predictive value (PPV) (the number of true positives/[true positives + false positives]), and negative predictive value (NPV) (the number of true negatives/[false negatives + true negatives]). StatCalc was used to determine the kappa coefficient of agreement, which is an index that compares the agreement against that which might be expected by chance. Kappa can be thought of as the chance-corrected proportional agreement, and possible values range from +1 (perfect agreement) to 0 (no agreement above that expected by chance) to -1 (complete disagreement).

RESULTS

Comparison using venipuncture-derived whole blood. Among the 43 venipuncture-derived whole-blood samples, HIV-1 RNA was detected in the plasma of 10 positive patients who had also tested positive using buffy coat with the Amplicor test. Therefore, NucliSENS showed 100% sensitivity and specificity (Table 1). The PPV and NPV were also 100%. A perfect concordance was found between the two tests on venipuncture derived blood with a kappa coefficient of 1 ($P < 0.001$, Table 1).

Comparison between NucliSENS and Amplicor showed a sensitivity of 100% (95% CI = 65.5 to 100%), a specificity of 100% (95% CI = 87 to 100%), a PPV of 100% (95% CI = 65.5 to 100%), and an NPV of 100% (95% CI = 87 to 100%).

Comparison to DBS. HIV-1 RNA was detected by NucliSENS in all 19 DBS that also tested positive by Amplicor. No specimen tested positive by Amplicor but negative by NucliSENS. The statistical analysis gave a kappa coefficient of 1 ($P < 0.001$), showing perfect concordance between the two tests with DBS (Table 1). The performance comparison between NucliSENS and Amplicor showed a sensitivity of 100% (95% CI = 79.1 to 100%), a specificity of 100% (95% CI = 96.4 to 100%), a PPV of 100% (95% CI = 79.1 to 100%), and an NPV of 100% (95% CI = 96.4 to 100%).

Viral loads and optical density. Tables 2 and 3 summarize the distribution of HIV-1 RNA viral loads among infected infants in DBS and venipuncture-derived whole blood, respectively. The median interquartile range (IQR) viral load among positive samples was high: 410,000 IU/ml (1,900 to 59,000,000 IU/ml). The median IQR optical density was 2.951 (1.073 to

TABLE 2. Ranges of positive detection in infants by Amplicor and NucliSENS using positive DBS

Sample	Subject age (mo)	OD* (Amplicor)	Viral load (IU/ml) (NucliSENS)
3312-hald	3	2.881	14,000
3238-hald	7	3.062	32,000
3225-hald	6	2.664	36,000
2842-haldb	7	2.774	97,000
3190-hald	24	3.129	210,000
3427-hald	8	2.737	556,800
3094-hald	6	2.438	817,800
2947-haldb	12	3.123	120,000
3016-hald	9	2.979	130,000
2844-hald	12	2.996	160,000
2830-hald	2	3.011	160,000
2947-haldb	15	3.027	170,000
2977-hald	2	3.008	1,900
2842-haldb	1.5	2.764	22,000
3107-hald	12	1.249	38,000
3112-hald	3	2.959	410,000
3138-hald	24	2.91	480,000
18DK002	4	3.047	520,000
2943-hald	5	2.948	520,000

* OD, optical density.

3.129). A level of $\geq 5,000$ IU/ml is considered positive, while tests with results lower than that value should be repeated based on a new extraction of the sample. In the present study, only one sample showed a viral load of $< 5,000$ IU/ml, but its optical density using Amplicor was 3.008, allowing us to consider this sample HIV-1 positive.

DISCUSSION

The comparison of results from venipuncture samples in EDTA tubes shows high concordance between the two techniques, with 100% sensitivity and specificity for the NucliSENS EasyQ assay. These findings are supported by Young et al. (32), who published identical results in 2000 in their study of 2-month-old children in Thailand whose venipunctures were tested by PCR analyses of RNA and DNA.

The sensitivity and specificity of NucliSENS were 100% compared to Amplicor with DBS samples. The Amplicor technology was validated with HIV-1 serology at 18 months of life as the reference, and a similar study is now needed to determine the sensitivity and specificity of the NucliSENS technology.

NucliSENS is an isothermal RNA amplification technique with real-time detection, combining manual extraction with simultaneous amplification and detection by fluorescence quantification. The major advantage of NucliSENS is that it provides information not only on infection but also on the level of viral replication. The NucliSENS technique is also simpler, easier to implement, and quicker (4 h), particularly the extraction, than other commercialized plasma RNA quantification kits, notably Roche's Amplicor kit (28). The DNA-based Amplicor technique is the reference for early diagnosis of HIV-1 infection in children, and its performance with venipuncture and filter paper samples has been validated in many studies in northern and southern countries (24). All our results were validated by the proviral DNA Amplicor technique and there-

TABLE 3. Ranges of positive detection in infants by Amplicor and NucliSENS using positive venipuncture-derived blood

Sample	Subject age (mo)	DNA-derived whole blood OD* (Amplicor)	Plasma RNA viral load (IU/ml) (NucliSENS)
2853-hald	5	2.986	650,000
3064-hald	9	3.075	3,100,000
3091-hald	1.5	1.073	7,400,000
3176-hald	4	2.935	17,000,000
3177-hald	7	2.901	470,000
3178-hald	5	2.951	1,100,000
3179-hald	3	3.075	59,000,000
3020-hald	16	2.609	2,400,000
653hpd	5	3.129	13,000,000
A3-348	5	2.835	7,600,000

* OD, optical density.

fore confirm the diagnostic performance of the NucliSENS technique.

In Thailand, where the recombinant HIV-1 subtype (CRF01_AE) is predominant (9), research has shown that Amplicor sensitivity with buffy coat samples increases from 40% at the time of birth to 100% at the age of 2 months, and its specificity is 100% regardless of age. Studies performed in the United States compared the use of proviral DNA and plasma RNA for neonatal diagnosis. The sensitivity of all of these tests varies according to age. Among neonates under the age of 3 weeks, sensitivities of 27% for DNA PCR, 64% for quantitative RNA PCR, and 55% for qualitative tests were found. These same tests have sensitivities of 96.2% in neonates aged between 4 and 6 weeks and 100% at > 7 weeks. The DNA PCR specificity for all of these age groups is 100%, whereas those of the quantitative and qualitative RNA PCRs are 95.5 and 96.1% (5).

Our data showed that viral loads in infected infants were very high. This is consistent with other studies detecting the viral loads in children (4, 5, 9–11). Because of this usually high viral load in children, we recommend that a threshold of 5,000 IU/ml be used to interpret HIV-1 positivity, and we consider that cases below this value should be repeated to avoid false positivity. Our recommendation is twice lower than the one reported by Lilian et al. (10), because we found the NucliSENS very sensitive in this evaluation. Overall, NucliSENS EasyQ test appears to perform well for HIV-1 detection in children for high and medium viral load ranges. However, further studies need to be done to validate its sensitivity in low viral load categories.

HIV-1 RNA appeared to be less stable than DNA on the DBS, particularly at low viral load levels and at room temperature. For RNA tests, DBS samples should be stored at or below -20°C for long periods to avoid nucleic acid degradation.

Vertical transmission of HIV causes a high level of infant mortality. An early diagnosis of HIV infection in newborns is necessary to initiate therapy as early as possible. The NucliSENS EasyQ platform is a good alternative for the early diagnosis of HIV infection due to its high sensitivity and specificity. This platform indicates both patient infection status and the baseline viral load.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge support from the Ministry of Health via the National Program against AIDS and STIs.

REFERENCES

- Cassol, S., et al. 1994. Rapid screening for early detection of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 32:2641-2645.
- Cassol, S. A., et al. 1992. Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spot specimens. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5:113-119.
- Comeau, A. M., et al. 1992. Polymerase chain reaction in detecting HIV infection among seropositive infants: relation to clinical status and age and to results of other assays. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5:271-278.
- Crook, T. L., et al. 2007. Infant human immunodeficiency virus diagnosis in resource-limited settings: issues, technologies, and country experiences. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:S64-S71.
- Cunningham, C. K., et al. 1999. Comparison of human immunodeficiency virus 1 DNA polymerase chain reaction and qualitative and quantitative RNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus 1-exposed infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:30-33.
- De Rossi, A., et al. 1991. Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction and *in vitro* antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS* 5:15-20.
- Fransson, K., et al. 1994. Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1-infected primary lymphocytes. *Mol. Cell Probes* 8:317-322.
- Kane, C. T., et al. 2008. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *J. Virol. Methods* 148:291-295.
- Leslawitwa, W., et al. 2009. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *J. Virol. Methods* 155:109-117.
- Lilian, R. R., K. Bhowan, and G. G. Sherman. 2010. Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 infection in infants with the NucliSens EasyQ assay on dried blood spots. *J. Clin. Virol.* 48:40-43.
- Lofgren, S. M., et al. 2009. Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS* 23:2459-2466.
- McInosh, K., et al. 1994. Blood culture in the first 6 months of life for the diagnosis of vertically transmitted human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 170:996-1000.
- Mehta, N., et al. 2009. Low-cost HIV-1 diagnosis and quantification in dried blood spots by real-time PCR. *PLoS One* 4:e5819.
- Neshel, S., et al. 1997. Diagnosis of perinatal human immunodeficiency virus infection by polymerase chain reaction and p24 antigen detection after immune complex dissociation in an urban community hospital. *J. Infect. Dis.* 175:1333-1336.
- Ngo-Giang-Huong, N., et al. 2008. Early HIV-1 diagnosis using in-house real-time PCR amplification on dried bloodspots for infants in remote and resource-limited settings. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 49:465-471.
- Patton, J. C., et al. 2007. Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnostic laboratory. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:201-203.
- Pfowar-Manning, E., I. Lugalla, B. Kafufe, and J. B. Jackson. 2008. Comparison of results obtained with Amplicor HIV-1 DNA PCR test version 1.5 using 100 versus 500 microliters of whole blood. *J. Clin. Microbiol.* 46:1104-1105.
- Rakusan, T. A., R. H. Parrott, and J. L. Sever. 1991. Limitations in the laboratory diagnosis of vertically acquired HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 4:116-121.
- Reigadas, S., M. H. Schrive, V. Aurillac-Lavignotte, and H. J. Fleury. 2009. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *J. Virol. Methods* 161:177-180.
- Ritch, K. C., et al. 1997. Immune complex-dissociated p24 antigen in congenital or perinatal HIV infection: role in the diagnosis and assessment of risk of infection in infants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 12:198-203.
- Rodes, B., et al. 2007. Quantitative detection of plasma human immunodeficiency virus type 2 subtype A RNA by the NucliSENS EasyQ Assay (version 1.1). *J. Clin. Microbiol.* 45:88-92.
- Romet, F., et al. 2001. Early diagnosis of paediatric HIV-1 infection among African breast-fed children using a quantitative plasma HIV RNA assay. *AIDS* 15:1849-1856.
- Shermann, G. G., G. Stevens, S. A. Jones, P. Horsfield, and W. S. Stevens. 2005. Dried blood spots improve access to VIH diagnosis and care for infants in low-resource setting. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38:615-617.
- Sherman, G. G., et al. 2005. Polymerase chain reaction for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants in low resource settings. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24:993-997.
- Spira, R., et al. 1999. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. *Pediatrics* 104:e56.
- Stekete, R. W., et al. 1997. Early detection of perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection using HIV RNA amplification and detection. *J. Infect. Dis.* 175:707-711.
- Stevens, W., I. Erasmus, M. Motol, T. Taleng, and S. Sarang. 2008. Performance of a novel human immunodeficiency virus (HIV) type 1 total nucleic acid-based real-time PCR assay using whole blood and dried blood spots for diagnosis of HIV in infants. *J. Clin. Microbiol.* 46:3941-3945.
- Stevens, W., L. Wiggill, P. Horsfield, I. Coetzee, and L. K. Scott. 2004. Evaluation of the NucliSENS EasyQ assay in HIV-1-infected individuals in South Africa. *J. Virol. Methods* 124:105-110.
- Ugochukwu, E. F., and S. O. Kann. 2010. Early infant diagnosis of HIV infection in southeastern Nigeria: prevalence of HIV infection among HIV-exposed babies. *West Afr. J. Med.* 29:3-7.
- UNAIDS. 2010. UNAIDS report on the global AIDS epidemic. UNAIDS, New York, NY. http://www.unaids.org/globalreport/global_report.htm.
- Volari, A., et al. 2008. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N. Engl. J. Med.* 359:2233-2244.
- Young, N. L., et al. 2000. Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtypes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 24:401-407.



Comparison of four commercial viral load techniques in an area of non-B HIV-1 subtypes circulation



Ousseynou Ndiaye^a, Halimatou Diop-Ndiaye^{a,*}, Abdou Salam Ouedraogo^b,
Fatim Zahra Fall-Malick^a, Amina Sow-Sall^a, Moussa Thiam^a,
Abou Abadallah Malick Diouara^a, Cheikh Tidiane Ndour^a, Aïssatou Gaye-Diallo^a,
Souleymane Mboup^a, Coumba Toure-Kane^a, Study Group¹

^a Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Laboratoire de Bactériologie-Virologie CHU A. le Dantec, Dakar, Senegal

^b Université de Ouagadougou, Service de Bactériologie-Virologie, CHU Soura Sanou, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

ABSTRACT

Article history:

Received 6 March 2015

Received in revised form 1 June 2015

Accepted 4 June 2015

Available online 9 June 2015

Keywords:

HIV-1

Viral load

Comparison

The aim of this study was to compare four HIV-1 viral quantitation platforms, Nuclisens EasyQ v2.0[®] (EQ), COBAS AmpliPrep/Cobas Taqman[®] HIV-1 test v 2.0 (CTM), GENERIC HIV CHARGE VIRALE[®] (GEN), with Abbott Real Time HIV-1[®] (m2000sp/rt) as reference technique.

The study had first evaluated m2000sp/rt performances and then compared quantitation between techniques. Discordant samples were genotyped on gag and pol gene and sequences were analyzed using Sequence locator and SeqPublish to detect eventual mismatches.

Performance analysis of m2000sp/rt showed good results with coefficients of variation values (CV) of 1.35%, 0.65%, and 0.54% for repeatability testing of low, intermediate and high concentrations, respectively. Reproducibility tests showed low CV values with 2.36% and 1.42% for low and high concentration levels, respectively and contamination test was very low value with 0.94%.

Correlation and concordance between techniques ranged from $r^2 = 0.98$ and bias = -0.00185 (for m2000sp/rt vs CTM) to $r^2 = 0.90$ and bias = -0.135 (for EQ vs GEN). Discrepancies were observed on 37 samples mostly CRF02_AG but despite some mismatches, sequence analysis (26/37) did not show any remarkable differences between CRF02_AG queries and references.

This study showed good correlation and good concordance between techniques. However, EQ yielded under-quantitation of CRF02_AG.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The last WHO guidelines recommend an early antiretroviral treatment (ART) initiation with CD4 count less than 500 cells/mm³. Therefore the number of patients fulfilling the criteria to receive a highly active antiretroviral therapy (HAART) will increase (WHO, 2013). According to the low possibilities of antiretroviral regimens in resource poor-settings, the challenge is to maintain patients as long as possible under first line regimen (Hirsch et al., 2008). In order to achieve this goal, the strong recommendation from the WHO is to use viral load (VL) determination as the gold standard

for the evaluation of treatment efficacy (with a VL at the lowest possible level) and/or the detection of an earlier virological failure. Indeed, virological failure occurs before the immunological and clinical failures, which may lead to anticipation of therapeutic regimen changes (Da Silva et al., 2010). All the sub-Saharan countries are in the process of implementing a strategic plan for scaling up viral load testing to reach everyone receiving ART. For this VL determination, several techniques are available and were developed based on subtype B (Holguin et al., 2008; Braun et al., 2007), which represent around 10% of HIV strains worldwide. Subtype B is mainly found in Europe and northern countries while non-B subtypes predominate in the world. Numerous studies have shown that certain variants are missed or under quantified by some VL assays such as CRF02_AG, which is predominant in Senegal and other West African countries. (Swanson et al., 2005; Wang et al., 2008; Drexler et al., 2007; Geelen et al., 2003).

Despite its low HIV prevalence, Senegal is characterized by a high genetic diversity with a circulation of many HIV variants.

* Corresponding author at: Université Cheikh Anta Diop, Dakar, and Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal. Tel.: +221 33 821 64 20; fax: +221 33 821 64 42.

E-mail address: halimatoudiop@yahoo.fr (H. Diop-Ndiaye).

¹ The authors listed in the Study Group are given in Appendix A.

CRF02_AG represent around 60% of HIV strains in general population (Thiam et al., 2013) and sex workers (Hamel et al., 2007) while subtype C is predominant in the MSM group (Ndiaye et al., 2013). Senegal has launched an ART initiative since 1998 (Laurent et al., 2005), and around 18,352 patients were actually under HAART throughout the country (Conseil National de Lutte contre le Sida, 2011). In the perspective of VL monitoring scaling up, there is a need to evaluate locally the different VL platforms according to HIV strains circulating in Senegal. Therefore, the aim of this study was to compare four commercial techniques, Nuclisens EasyQ v2.0[®] (BioMérieux, Lyon, France), HIV-1 V2.0 COBAS AmpliPreP/COBAS TaqMan[®] (Roche Molecular Diagnostics, Basel Switzerland), GENERIC HIV CHARGE VIRALE assay[®] (Bio-centric, Bandol, France) and Abbott Real Time HIV-1[®] (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Germany), defined as reference technique.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Blood samples were collected by venipuncture using Ethylene Diamine Tetra Acetic (EDTA) tubes from patients or blood donors and cells separation was processed to obtain plasma within 4 h after collection. Plasma aliquots for each platform were stored frozen (−80 °C) until testing.

2.2. HIV-1 viral load quantitation

Study was performed in two steps: the first step was to verify on site the HIV Abbott Real Time performances using HIV-1 plasma from blood donor and the second one was to compare VL quantitations using other three techniques mentioned above. The viral quantitation was performed for each platform according to the manufacturer's instructions.

2.2.1. Abbott Real Time technology

Abbott Real Time HIV-1 assay (m2000sp/rt) is an in vitro qRT-PCR targeting the integrase region of the highly conserved *pol* gene. Real time detection uses a partially labelled double-strand probe. A partial sequence of the pumpkin polymerase gene acts as an internal control and is amplified simultaneously with the sample. This assay detects HIV-1 group M, N, O and P and several CRFs (Church et al., 2011). A fully automatic extraction was performed with the Abbott m2000sp and the amplification coupled with real time detection was realized with the Abbott m2000rt. The assay dynamic range is 1.60–7.0 log₁₀ copies/ml for 600 µl of plasma samples.

2.2.2. m2000sp/rt performances evaluation

Performances of m2000sp/rt were evaluated by testing the repeatability using 3 levels of concentration of plasma from three blood donors and 30 aliquots for each concentration level. For reproducibility, the values of high and low positive controls from the same batch of m2000sp/rt kit were collected within 30 different series. Coefficients of variation (CV) for accuracy and uncertainties were calculated and were compared to manufacturer's CV values. For contamination control, a high positive sample was analyzed three times consecutively (H1, H2, H3 with mH of mean) followed by a low positive sample analyzed also three times consecutively (B1, B2, B3). The sequence H1, H2, H3 and B1, B2, B3 was repeated 5 times to determine the B1 (mB1) and B3 (mB3) means. Significant statistic difference between the 2 means was established with the student test before calculating the percentage of contamination.

2.2.3. Nuclisens HIV EasyQ technology

Nuclisens EasyQ v2.0 (EQ) assay performs an isothermal viral RNA amplification using a molecular beacon (NASBA) targeting the HIV-1 p24 gag gene (Gomes et al., 2013). An internal control was simultaneously extracted and amplified by the EasyQ instrument. This assay detects HIV-1 group M and several circulating recombinant forms or CRF (de Baar et al., 2001). A fully automatic platform was used to extract nucleic acids from 200 µl of plasma using Nuclisens EasyMAG automate followed by NASBA amplification and Real time detection on the EasyQ automate. The assay dynamic range is 1.3–7.0 log₁₀ copies/ml from plasma samples.

2.2.4. COBAS TaqMan technology

COBAS AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test v2.0 (CTM) uses a qRT-PCR amplifying a conserved region in gag gene and LTR region using a TaqMan probe. CTM use an internal control simultaneously extracted and detects with each sample. This assay detect group M, O, and several CRFs (Church et al., 2011). The VL determination was performed using the COBAS AmpliPrep nucleic acid extractor from 1 ml of plasma then the amplification and real time detection were realized using COBAS TaqMan 48. The assay dynamic range is 1.3–7.0 log₁₀ copies/ml of plasma.

2.2.5. GENERIC HIV CHARGE VIRALE technology

GENERIC HIV CHARGE VIRALE (GEN) is a qRT-PCR targeting a conserved region of LTR from HIV genome and VL was determined using a TaqMan probe. This assay detects group M, O and several CRFs (Rouet et al., 2010). A manual RNA extraction was performed with Qiagen spin column (Qiagen, Courtaboeuf, France) from 200 µl of plasma. Amplification was performed on ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). GEN kit used an external standard but did not include an internal control. The assay dynamic range is 2.48–7.0 log₁₀ copies/ml from plasma sample.

2.3. Genotyping and phylogenetic analysis

Any discordant samples with a VL ≥ 3.0 log were genotyped in gag and pol gene. For pol gene, the entire protease gene and a fragment encoding the 240 first amino acid of RT gene were amplified by a nested RT-PCR using the HIV French drug resistance technique (<http://www.hivfrenchresistance.org>). For gag gene, the partial p24 region was amplified as previously described (Toure-Kane et al., 2000). PCR products were purified (Qiagen, Valencia, Spain) and directly sequenced on ABI 3100-Avant using BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The generated sequences were edited using the SeqMan II software programme from the DNASTAR package v.5.08 (Lasergene, Madison, WI).

HIV-1 subtype and CRF designations were determined by phylogenetic analysis. The nucleotide sequences were aligned using a neighbour-joining with 100 bootstrap replicates, as implemented in the Seaview software (Gouy et al., 2010). All pure subtypes and CRFs available in the Los Alamos database and circulating in West Africa were included in this analysis. Similarity analysis and Bootscanning were performed with the Simplot version 3.5.1 software to confirm any recombinant virus.

In order to highlight any differences that could influence the technique performances, polymorphism analysis was studied for CRF02_AG sequences that showed discrepant results between techniques. Sequences were analyzed using the SeqPublish and Sequence Locator from Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). The HXB2 sequence (accession no. K03455) and some CRF02_AG of Senegal from GenBank were added as references and aligned.

2.4. Statistical analysis

For the comparison of VL platform quantitations, correlation and concordance tests were determined between *m2000sp/rt* and the others with MethVal software. Limit of detection between *m2000sp/rt*, CTM and EQ was considered as equal to 1.6 log₁₀ copies/ml and the limit of detection between GEN and the other platforms was 2.48 log₁₀ copies/ml. Differences between VL were considered as significant when the value was greater than 0.5 log₁₀ copies/ml.

3. Results

3.1. Performance analysis of *m2000sp/rt*

Abbott Real Time performance was assessed using repeatability, reproducibility, uncertainties, accuracy and contamination.

For repeatability, the CV values were 1.35% [0.44–1.37], 0.65% [0.44–0.72], 0.54% [0.46–0.72] for low, intermediate and high concentrations, respectively. For reproducibility, CV values were 2.36% [1.34–2.84] and 1.42% [1.32–1.44] for low and high concentration levels, respectively.

Accuracy and uncertainties were evaluated based on the results of reproducibility of the two panels (low and high concentration). For accuracy, the CV values were 1.02% for the low concentration and 0.20% for the high concentration. The uncertainties were ±0.14 for low and high concentrations, each. The level of contamination evaluated 5 times using 2 values (high and low concentrations) was 0.94%.

3.2. Comparison of viral load results

3.2.1. Comparison between *m2000sp/rt* and CTM

To compare VL between *m2000sp/rt* and CTM, 81 samples were tested on both platforms. VL was detectable in 52 samples by *m2000sp/rt* and 56 samples by CTM. The means of VL were 4.03 log₁₀ copies/ml for *m2000sp/rt* and 3.86 log₁₀ copies/ml for CTM. Among the 59 samples detected by *m2000sp/rt* and/or CTM, 3 discrepancies were observed: two samples detected around 3 log₁₀ copies/ml by CTM were below the detection limit of *m2000sp/rt*, and the other one was detectable at 2.75 log₁₀ copies/ml by *m2000sp/rt* and under quantified by CTM. The Pearson's correlation was good between the two techniques with $r^2 = 0.98$ and mean difference of -0.00185 (Fig. 1).

3.2.2. Comparison between *m2000sp/rt* and EQ

Comparison of VL between *m2000sp/rt* and EQ was performed on 73 samples. *m2000sp/rt* assay showed 51 samples that had detectable VL with a mean of 4.09 log₁₀ copies/ml while EQ platform showed 46 samples with detectable VL with a mean of 4.10 log₁₀ copies/ml. Among the 52 samples detected by *m2000sp/rt* and/or EQ, 20 had discrepancies VL ranged from 2 to 6 log₁₀ copies/ml including 4 samples under quantified by *m2000sp/rt* and 16 samples by EQ. A good correlation was found between *m2000sp/rt* and EQ with $r^2 = 0.96$ and mean difference of -0.144 (Fig. 1).

3.2.3. Comparison between *m2000sp/rt* and GEN

Of the 123 samples tested, 45 were detectable by the *m2000sp/rt* and 56 samples were detectable by GEN. The means of VL were 4.39 log₁₀ copies/ml for *m2000sp/rt* and 4.07 log₁₀ copies/ml for GEN. Of the 59 samples detected by *m2000sp/rt* and/or GEN, 13 presented discrepancies with VL >0.5 log, including 5 samples under quantified by *m2000sp/rt* (with 2 below the detection limit). Comparison of VL quantitation between *m2000sp/rt* and GEN

showed a good correlation with $r^2 = 0.96$ and a bias of -0.144 (Fig. 1).

3.2.4. Comparison between EQ and GEN

Comparison of VL between EQ and GEN was performed on 73 samples. Samples tested by EQ showed 41 detectable with a mean VL of 4.39 log₁₀ copies/ml and samples tested by GEN showed 54 detectable with a mean VL of 4.11 log₁₀ copies/ml. Of the 54 samples detected by EQ and/or GEN, 20 discrepancies were found with 14 under quantified by EQ. Comparison of VL quantitation between GEN and GEN showed a coefficient of correlation of $r^2 = 0.90$ and a mean difference of -0.135 (Fig. 1).

3.2.5. Comparison between CTM and EQ

To compare the VL between CTM and EQ, 72 samples were tested on both platforms with 52 and 45 samples were detectable by CTM and EQ, respectively. The means of VL were 3.94 log₁₀ copies/ml for CTM and 4.17 log₁₀ copies/ml for EQ. Of the 54 samples with VL detected at least by one technique, 17 presented discrepancies with 5 under quantified by CTM and a good correlation $r^2 = 0.95$ and a bias of -0.122 were found between CTM and EQ (Fig. 1).

3.2.6. Comparison between CTM and GEN

Comparing the VL between CTM and GEN, 81 samples were tested on both platforms. For CTM platform, 43 were detectable with a mean VL of 4.42 log₁₀ copies/ml and for GEN platform, 55 samples were detectable with a mean VL of 4.08 log₁₀ copies/ml. Of the 57 samples with detectable VL by CTM and/or GEN, 14 samples presented discrepancies with 7 under quantified by CTM. Comparison of VL quantitation between CTM and GEN showed for correlation $r^2 = 0.94$ and a bias of -0.0512 (Fig. 1).

3.2.7. Analysis of discrepancies

VL comparison showed a total of 86 discrepancies and the best concordance was found between *m2000sp/rt* and CTM (3 discrepancies). EQ and GEN presented 20 discrepancies with the highest bias value. All discrepancies repertoires concerned 37 samples and most of them were related to EQ platform that under quantified 9/20 samples CRF02_AG discordant samples (Table 1).

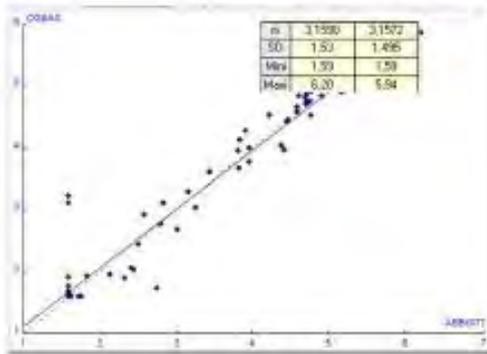
To better assess EQ misquantitation, 461 pb of gag p24 was analyzed from 21 sequences including the 9 CRF02_AG under quantified by comparison with HXB2 (HIV-1 subtype B, accession no. K03455) and some Senegalese strains of CRF02_AG. Analysis did not show any remarkable differences between submitted CRF02_AG and references despite some mismatches found (Fig. 2).

4. Discussion

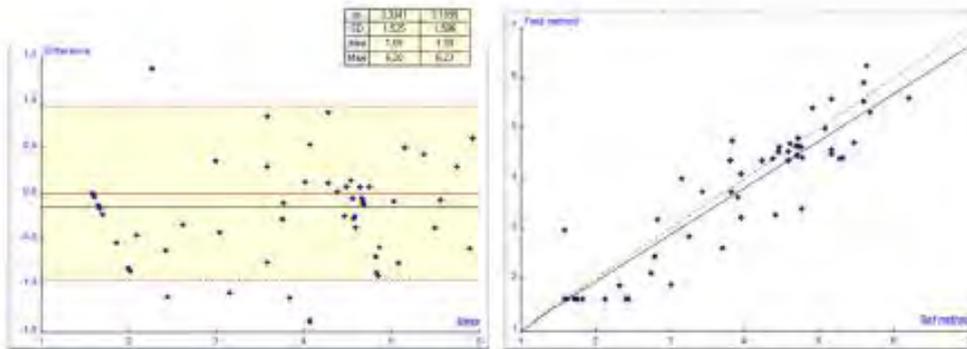
In the context of Resource-Limited Setting (RLS), VL is a strong recommendation by WHO for monitoring patients under ART as a marker predicting the risk of disease progression (Yilmaz, 2001). VL is the only marker that could confirm HAART success and detect earlier virological failure requiring the switch to second line regimen (Bekker et al., 2006). So, VL is crucial for the monitoring of patients under ART and a rational use of ARVs at programmatic level.

In Senegal, several VL techniques are available for the monitoring of patients under ART. However, with the high genetic diversity, it becomes important to evaluate these techniques according to the main HIV-1 strains circulating in the country. This study aimed to compare the performances of four techniques for a potential use and appropriate switch between them in the context of RLS characterized by the problems of procurement timely.

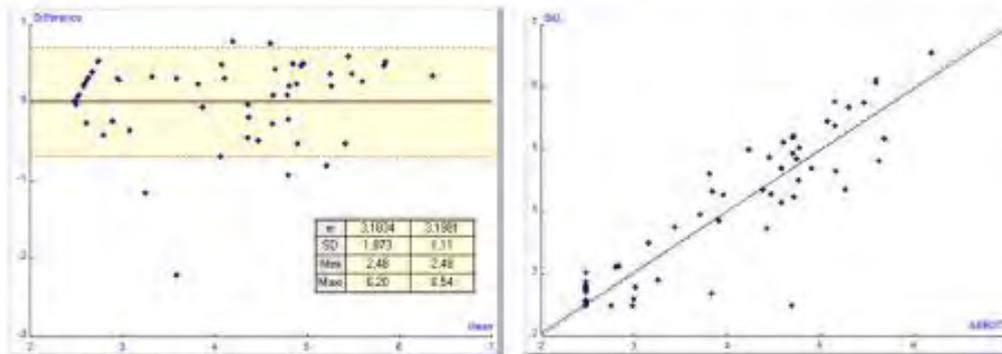
m2000sp/rt was used as the reference method because of its routine use in the laboratory and its regular external quality control.



a) *m2000sp/rt* vs CTM (n=81) : Bias = -0.00185 and $r^2=0.98$

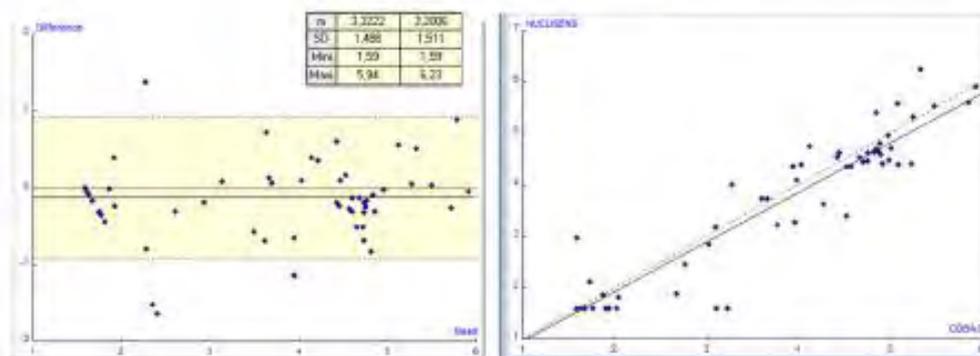


b) EQ vs *m2000sp/rt* (n=73) : Bias: = - 0.144 and $r^2 = 0.96$

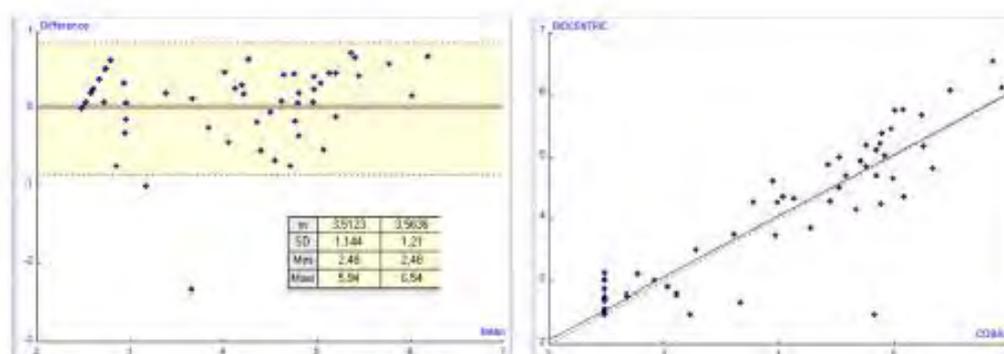


c) *m2000sp/rt* vs GEN (n=123) : Bias = 0.0147 and $r^2= 0.95$

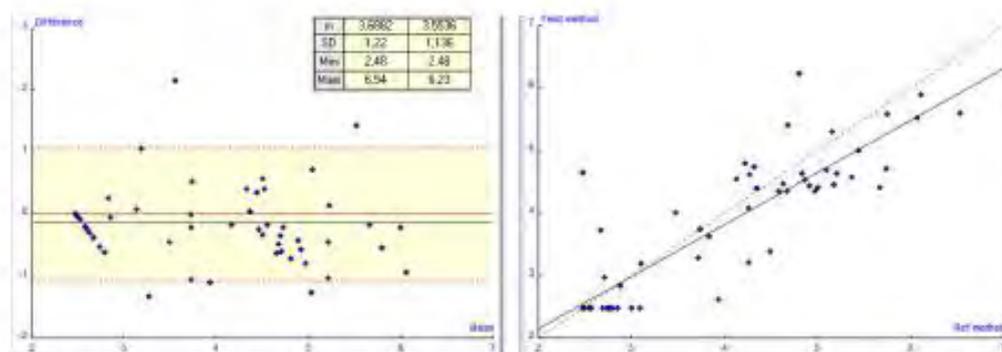
Fig. 1. Comparison between platforms using Bland Altman and correlation coefficient.



d) CTM vs EQ (n=72) : Biais = -0.122 and $r^2 = 0.95$



e) CTM vs GEN (n=81) : Biais -0.0512 and $r^2=0.94$



f) EQ vs GEN (n=73) : Biais -0.135 and $r^2=0.90$

Fig. 1. (Continued)

Table 1
Samples presenting viral load with relevant difference.

Dossier	VIRAL LOAD				VL DIFFERENCE						Sub type	
	M2000	EQ	CTM	GEN	M2000 vs GEN	M2000 vs CTM	M2000 vs EQ	EQ vs CTM	EQ vs GEN	CTM vs GEN	GAG	POL
ED-001	2,75	2,11	1,73	N D	0,27	0,02	0,02	0,38	-	-	NS	NS
ED-002	2,14	ND	1,95	ND	-	0,19	0,02	0,36	-	-	NS	NS
ED-003	2,41	1,81	2,05	2,50	-0,02	0,36	0,02	-0,24	-0,02	-0,02	NS	NS
ED-004	2,80	2,45	2,77	3,10	-0,30	0,03	0,36	-0,32	0,02	-0,33	02_AG	02_AG
ED-005	N D	N D	3,11	2,78	-0,31	0,02	-	0,02	-0,31	0,32	NS	NS
ED-006	3,16	4,00	3,28	3,48	-0,32	-0,12	0,02	0,02	0,02	-0,20	02_AG	02_AG
ED-007	3,96	3,20	3,78	4,26	-0,30	0,19	0,02	0,02	0,02	-0,48	02_AG	02_AG
ED-008	3,81	4,34	3,95	4,59	0,02	-0,13	0,02	0,40	-0,25	0,02	NS	NS
ED-009	3,84	4,73	4,13	4,32	-0,49	-0,30	0,02	0,02	0,41	0,19	02_AG	02_AG
ED-010	3,91	3,62	4,28	3,84	0,07	0,37	0,29	0,02	-0,22	0,45	C	C
ED-011	4,23	4,34	4,53	4,98	0,02	-0,31	-0,12	-0,19	0,02	-0,45	02_AG	02_AG
ED-012	4,59	4,53	4,67	4,13	0,47	-0,08	0,08	-0,14	0,40	0,02	01_AE	01_AE
ED-013	4,71	4,45	4,76	5,18	-0,47	-0,04	0,27	-0,31	0,02	-0,42	02_AG	02_AG
ED-014	4,91	5,40	4,85	4,69	0,23	0,07	-0,28	0,02	0,02	0,16	D	D
ED-015	4,72	4,63	4,88	5,21	-0,49	-0,16	0,09	-0,25	0,02	-0,33	02_AG	02_AG
ED-016	5,16	4,57	4,90	5,37	-0,21	0,26	0,02	-0,33	0,02	-0,47	02_AG	02_AG
ED-017	4,78	4,40	4,92	5,01	-0,23	-0,14	0,38	0,02	0,02	-0,09	02_AG	02_AG
ED-018	5,47	4,70	5,01	5,74	-0,27	0,47	0,02	-0,31	0,02	0,02	02_AG	02_AG
ED-019	5,16	5,58	5,08	5,75	0,02	0,08	-0,42	0,50	-0,17	0,02	02_AG	02_AG
ED-020	5,31	4,40	5,24	5,67	-0,36	0,08	0,02	0,02	0,02	-0,44	02_AG	02_AG
ED-021	5,60	5,52	5,49	6,07	-0,47	0,11	0,08	0,03	0,02	0,02	02_AG	02_AG
ED-022	6,20	5,59	5,88	6,54	-0,33	0,35	0,02	-0,26	0,02	0,02	02_AG	02_AG
ED-023	N D	2,96	N D	2,71	-0,23	-	0,02	0,02	0,26	-0,23	NS	NS
ED-024	ND	INV	ND	2,99	0,02	-	-	-	-	0,02	NS	NS
ED-025	3,71	2,61	NP	3,94	-0,23	-	0,02	-	0,02	-	02_AG	02_AG
ED-026	3,02	1,88	2,68	2,77	0,25	0,34	0,02	0,02	-0,29	-0,09	NS	NS
ED-027	3,83	3,72	3,67	2,67	0,02	0,16	0,11	0,05	0,02	0,02	NS	06_cpx
ED-028	4,42	3,27	3,97	3,72	0,02	0,45	0,02	-0,45	0,25	0,02	02_AG	02_AG
ED-029	4,7	4,64	4,83	ND	0,02	-0,13	0,06	-0,19	0,02	0,02	49_cpx	49_cpx
ED-030	4,72	4,79	4,89	4,22	0,02	-0,17	-0,07	-0,1	0,02	0,02	C	C
ED-031	5,17	4,47	4,99	4,64	0,02	0,18	0,02	0,02	-0,17	0,35	02_AG	02_AG
ED-032	5,27	4,39	5,09	4,34	0,02	0,18	0,02	0,02	0,05	0,02	02_AG	02_AG
ED-033	5,63	6,23	5,34	4,81	0,02	0,29	0,02	0,02	0,02	0,02	02_AG	02_AG
ED-034	5,69	5,3	5,26	5,16	0,02	0,43	0,39	0,04	0,14	0,10	A3	A3
ED-035	2,45	ND	2,03	3,01	0,02	0,42	0,02	-0,44	0,02	0,02	NS	NS
ED-036	4,77	3,38	4,53	4,49	0,28	0,24	0,02	0,02	0,02	0,04	URF	02_AG
ED-037	ND	ND	3,23	ND	-	0,02	-	0,02	-	0,02	NS	NS

ND, not detected; NS, not sequenced; INV, invalid; NP, not performed.

Performances verification of this technique was acceptable compared to other studies (Scott et al., 2009; Sollis et al., 2014).

The comparison of VL quantitation techniques showed a high correlation and good agreement between techniques. The best

correlation ($r^2=0.98$) and agreement (bias = -0.00185 (-0.0761 to 0.0726)) was found between m2000sp/rt vs CTM and confirm results described by other studies (Scott et al., 2009; Bourlet et al., 2011). A low rate of false negative results (3/81 for each platform)

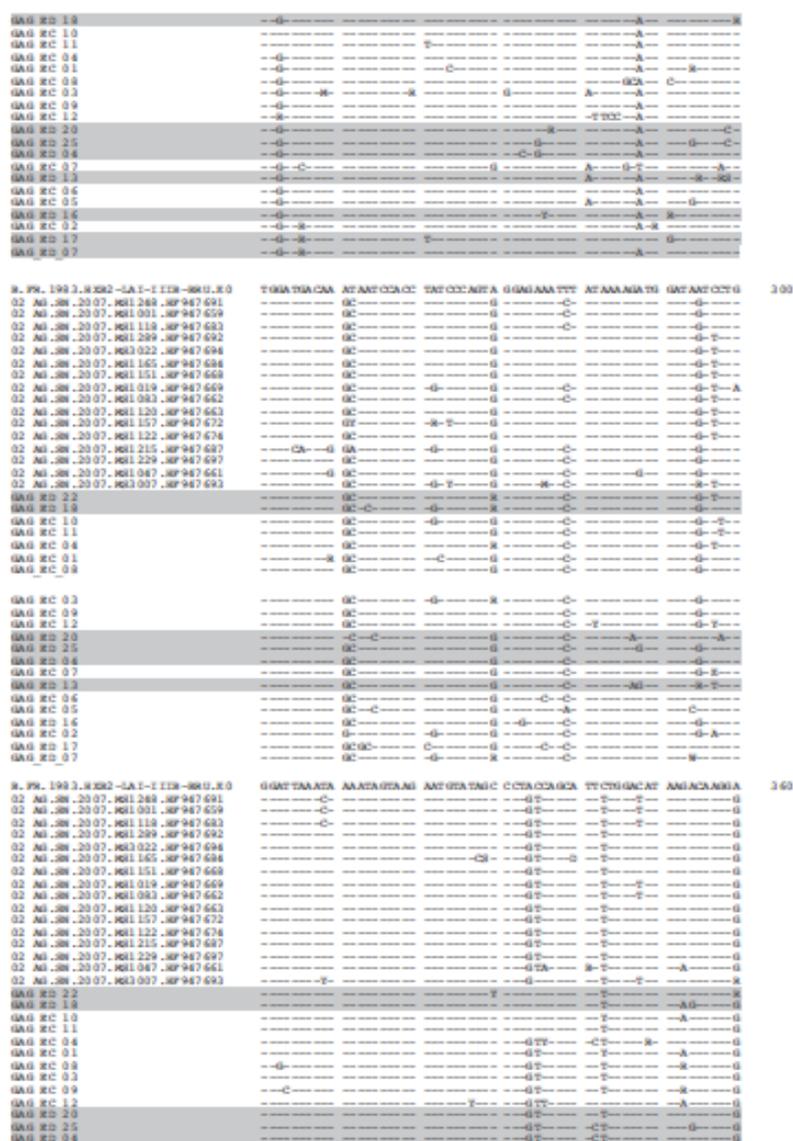


Fig. 2. (Continued)

and under quantified VL (2/81 by m2000sp/rt and 1/81 by CTM) is found between m2000sp/rt and CTM, and these discrepancies are related to samples with low or undetectable VL as reported in other studies (Bourlet et al., 2011; Church et al., 2011). The undetectable samples by the two techniques (CTM and m2000sp/rt) could be related to primer and probe mismatches in both pol-int and gag target regions (Church et al., 2011). Over quantification by the CTM may be due to amplification of dual targets (gag and LTR) and/or VL estimations (Bourlet et al., 2011).

Comparison of VL between m2000sp/rt and EQ had also showed a high correlation ($r^2=0.96$) and a relatively good agreement (bias = -0.144 (-0.256 to 0.0326)). However, a relative high number of false negative results (1/73 on m2000sp/rt and 6/73 on

EQ) and samples under quantified (5/73 m2000sp/rt and 15/73 EQ) was noted between the two platforms. Similar results were found between EQ and other platforms with a high number of false negative and samples under quantified by EQ and the lowest value of correlation was found between EQ and GEN ($r^2=0.90$ and a bias = -0.130). Many other studies reported similar data of EQ misquantitation with significantly lower viral loads, wider discrepancies (Bourlet et al., 2011), false negative results and under quantitation results for EQ particularly in non-B subtype samples (Church et al., 2011). Indeed, some studies reported difficulties of EQ platform to quantify the non-B subtypes including C, A1, AG, G and CRF02_AG (Hirsch et al., 2008; Korenromp et al., 2009). For CRF02_AG, our results confirm previous studies regarding EQ

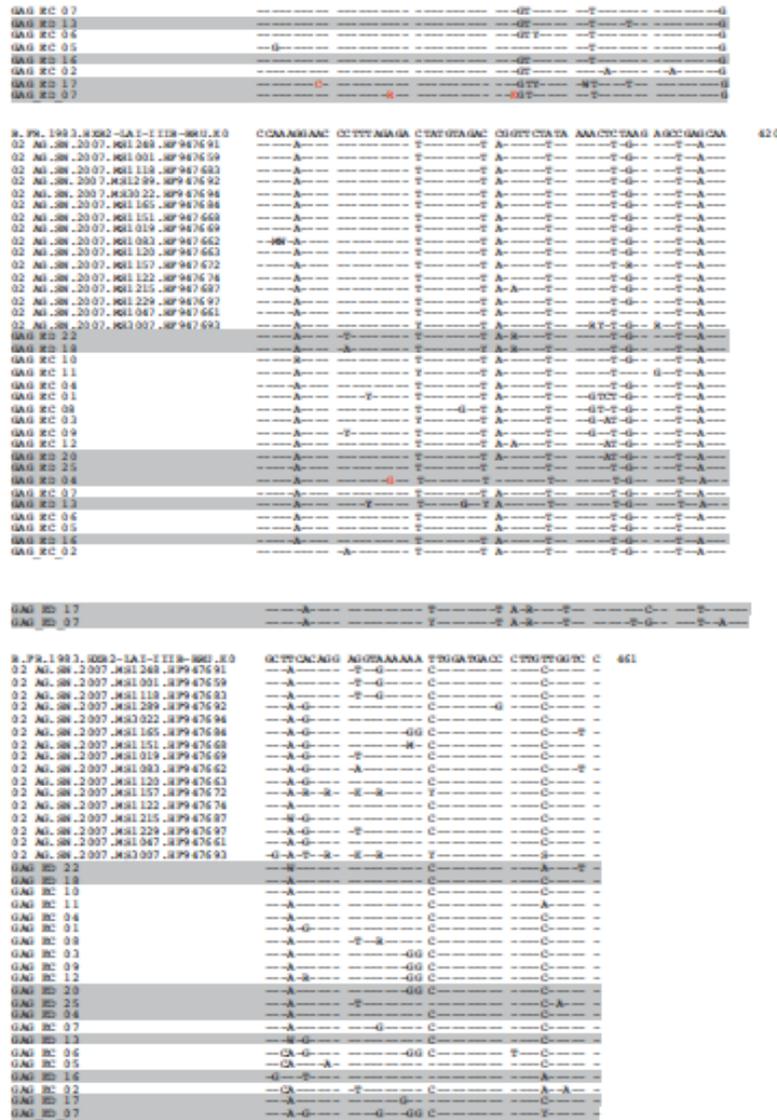


Fig. 2. (Continued).

under quantitation comparing to GEN and CTM (Rouet et al., 2010).

This lower correlation may be due to a combination of instability in the method (i.e., molecular beacon approach) as well as mismatches between probe and primers in the gag target region, particularly (Church et al., 2011). However, CRF02_AG sequence polymorphisms analysis in gag gene had not showed a specific pattern that could explain the failure or success to detect samples by the EQ technique. This could be due to the size of the sequenced region (461 pb of gag p24) that may not cover the right binding sites of EQ primers and/or probes. For GEN, the main limit was the lack of internal control in the test that is now taken into account in the new version (<http://www.biocentric.com>).

Despite, all these considerations, we cannot exclude that discrepancies observed between techniques could be related to the techniques themselves and/or targets that are different from one technique to another. Indeed, EQ targeted gag gene, that is less conserved than pol gene (m2000sp/rt) and the LTR region (GEN) while CTM increased its sensitivity by targeting one more region than EQ (gag and LTR) (Rouet et al., 2010).

In summary, the study found a good correlation between m2000sp/rt and other techniques and confirmed that EQ technique under quantified some CRF02_AG strains, which are the main variant circulating in Senegal and the West African region. Therefore, efforts to improve EQ performances for the quantitation of non-B strains, CRF02_AG in particular, are required.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank all patients who kindly accepted to participate in this study and also all medical staff from regional and central levels for their efforts and contributions to this study and EDCTP for their support through Wanetam.

Appendix A. Study Group

Kebe Khady, Nafissatou Leye Diouf, Ndiaye Aminata Diaw Diouf, Sada Diallo, Sokhna Bousso Gueye, Diabou Gueye (Laboratoires de Bactériologie Virologie CHU A. le Dantec, Dakar); Bineta Seck Fall, Maryvonne Maynard, Nougaye Gaye, Caroline Desclaux Sall (Centre Régional de Recherche et de Formation sur la Prise en charge clinique/Maladies Infectieuses Fann, Dakar).

References

- Bekker, L.G., Myer, L., Orrell, C., Lawn, S., Wood, R., 2006. Rapid scale-up of a community-based HIV treatment service: programme performance over 3 consecutive years in Guguletu, South Africa. *S. Afr. Med. J.* 96, 315–320.
- Bourlet, T., Signori-Schmuck, A., Roche, L., Icard, V., Saoudin, H., Traubad, M.A., Tardy, J.C., Morand, P., Pozzetto, B., Ecochard, R., André, P., 2011. HIV-1 load comparison using four commercial real-time assays. *J. Clin. Microbiol.* 49, 292–297.
- Braun, P., Ehret, R., Wiesmann, F., Zabbai, F., Knickmann, M., Kuhn, R., Thamm, S., Warnat, G., Knechten, H., 2007. Comparison of four commercial quantitative HIV-1 assays for viral load monitoring in clinical daily routine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 93–99.
- Church, D., Gregson, D., Lloyd, T., Klein, M., Beckwith, B., Laupland, K., Gill, M.J., 2011. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J. Clin. Microbiol.* 49, 118–124.
- Conseil National de Lutte contre le Sida, 2011. Rapport de situation sur la riposte nationale de l'épidémie de VIH/SIDA Sénégal: 2010–2011. http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/SEN_narrative_report_2014.pdf
- Da Silva, D., Van Weseenbeck, L., Breilh, D., Reigadas, S., Anies, G., Van Baelen, K., Morlat, P., Neau, D., Dupon, M., Wittkop, L., Fleury, H., Masquelier, B., 2010. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1262–1269.
- de Baar, M.P., van Dooren, M.W., de Rooij, E., Bakker, M., van Gemen, B., Goudsmit, J., de Ronde, A., 2001. Single rapid real-time nonheated isothermal RNA amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1378–1384.
- Drexler, J.F., de Souza Lima, L.K., Pedrosa, C., Pedral-Sampaio, D.B., Queiroz, A.T., Brites, C., Netto, E.M., Drostien, C., 2007. Rates of and reasons for failure of commercial human immunodeficiency virus type 1 viral load assays in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2061–2063.
- Geelen, S., Lange, J., Borrieffs, J., Wolfs, T., Weersink, A., Schuurman, R., 2003. Failure to detect a non-B HIV-1 subtype by the HIV-1 Amplicor monitor test, version 1.5: a case of unexpected vertical transmission. *AIDS* 17, 781–782.
- Gomes, F., Carvalho, A.P., Diogo, I., Gonçalves, F., Costa, I., Cabanas, J., Camacho, R.J., 2013. Comparison of the Nuclisens EasyQ HIV-1 v2.0 with Abbott m2000s RealTime HIV-1 assay for plasma RNA quantitation in different HIV-1 subtypes. *J. Virol. Methods* 193, 18–22.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Hamel, D.J., Sankalé, J.-L., Eisen, G., Meloni, S.T., Mullins, C., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Kanki, P.J., 2007. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23, 1189–1196.
- Hirsch, M.S., Günthard, H.F., Schapiro, J.M., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Hammer, S.M., Johnson, V.A., Kuritzin, D.R., Mellors, J.W., Pillay, D., Yeni, P.G., Jacobsen, D.M., Richman, D.D., International AIDS Society-USA, 2008. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Top. HIV Med.* 16, 266–285.
- Holguit, A., López, M., Molinero, M., Soriano, V., 2008. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas Amplicor/Cobas TaqMan HIV-1, and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2018–2023.
- Korenromp, E.L., Williams, B.G., Schmid, G.P., Dye, C., 2009. Clinical prognostic value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection – a quantitative review. *PLoS ONE* 4, e5050.
- Laurent, C., Ngom Gueye, N.F., Ndiour, C.T., Gueye, P.M., Diouf, M., Diakhate, N., Touré Kane, N.C., Laméle, I., Ndir, A., Vergne, L., Ndiaye, I., Mboup, S., Sow, P.S., Delaporte, E., ANRS 1215/1290 Study Group, 2005. Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38, 14–17.
- Ndiaye, H.D., Tchiakpe, E., Vidal, N., Ndiaye, O., Diop, A.K., Peeters, M., Mboup, S., Touré-Kane, C., 2013. HIV type 1 subtype C remains the predominant subtype in men having sex with men in Senegal. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 29, 1265–1272.
- Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valéa, D., Danaviah, S., Segondy, M., Verhofstede, C., Van de Perre, P., WHO/ANRS 1280 Kesho Bora Study Group, 2010. Comparison of the generic HIV viral load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantification of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *J. Virol. Methods* 163, 253–257.
- Scott, L.E., Noble, L.D., Moko, J., Erasmus, L., Venter, W.D., Stevens, W., 2009. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas Amplicor/Cobas Amplicor, Roche Cobas Amplicor/Cobas TaqMan HIV-1, and BioMérieux Nuclisens EasyQ HIV-1 assays. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2209–2217.
- Sollis, K.A., Smit, P.W., Fiscus, S., Ford, N., Vitoria, M., Essajee, S., Barnett, D., Cheng, B., Crowe, S.M., Denny, T., Landay, A., Stevens, W., Habyambere, V., Perrins, J., Peeling, R.W., 2014. Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. *PLoS ONE* 9, e85869.
- Swanson, P., de Mendoza, C., Joshi, Y., Golden, A., Hodinka, R.L., Soriano, V., Devare, S.G., Hackett Jr., J., 2005. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and Nuclisens HIV-1 QT. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3860–3868.
- Thiam, M., Diop-Ndiaye, H., Diouf, A.D., Vidal, N., Ndiaye, O., Ndiaye, I., Ngom-Gueye, N.F., Diallo, S., Diongue, O.D., Camara, M., Seck, A., Mboup, S., Touré-Kane, C., 2013. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. *J. Clin. Microbiol.* 51, 578–584.
- Touré-Kane, C., Moutarou, C., Faye, M.A., Gueye, P.M., Sow, P.S., et al., 2000. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 16, 603–609.
- Wang, Y., Song, A., Xu, S., Li, X., Chong, H., Zhao, C., Nie, J., Zhang, C., 2008. Impact of HIV-1 genetic diversity in China on the measurement of viral load. *J. Med. Virol.* 80, 1–8.
- World Health Organization, 2013. Guidelines. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection. Recommendations for a Public Health Approach, 272 pp. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf
- Yilmaz, G., 2001. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. *J. Clin. Virol.* 21, 187–196.

Résumé**Auteur : Ousseynou NDIAYE****Diversité génétique du VIH-1/VHC et ses implications
sur les techniques moléculaires de diagnostic et de monitoring du VIH-1****Résumé**

Le VIH et le VHC sont caractérisés par une grande diversité génétique et cette dernière est impliquée dans le diagnostic, le monitoring virologique, le traitement et la recherche vaccinale. L'objectif de ce travail est de déterminer la diversité génétique du VIH et du VHC chez les HSHs et les UDs respectivement et ses implications sur les plateformes de diagnostic et de monitoring du VIH-1. Nos travaux nous ont permis de trouver pour le VIH, la prédominance du sous-type C avec différents variants chez les HSHs même si c'est le CRF02_AG qui est majoritaire dans la population générale. De plus, ce travail a confirmé une fréquence élevée des doubles infections avec des sous-types/CRFs différents. Pour le VHC, la diversité génétique est caractérisée par la prédominance du génotype 1, toutefois c'est le génotype 2 qui est majoritaire en Afrique de l'ouest au niveau de la population générale. La comparaison des plateformes de diagnostic du VIH-1 ont permis de retrouver une bonne sensibilité et une bonne spécificité aussi bien sur le sang total que sur le DBS entre la plateforme commerciale NucliSENS et la technique de référence Amplicor. La comparaison de la charge virale a permis également de noter une forte corrélation et une bonne concordance entre les différentes techniques de charge virale et confirme également que la technique Nuclisens sous quantifie quelques échantillons CRF02_AG, lequel est prédominant au Sénégal.

Mots clés : VIH, VHC, diversité génétique et comparaison de techniques**Genetic diversity and implication in the diagnostic and monitoring molecular
of HIV-1 and HCV****Summary**

HIV and HCV are characterized by high genetic diversity and involved on the diagnosis, virological monitoring, treatment and vaccine research. The aim of our work is to determine HIV and HCV genetic diversity among HSHs and DUs respectively and the implication of HIV genetic diversity on diagnosis and monitoring platforms. Our work allowed finding for HIV the predominance of subtype C in HSHs even if the CRF02_AG was predominance in the general population. Moreover, this work confirmed a high prevalence of dual infections between subtypes/CRFs. For HCV, genetic diversity was characterized by the predominance of genotype 1 but genotype 2 more frequent in West Africa in the general population. HIV diagnostic platforms Comparison showed good sensitivity and good specificity between commercial platform (NucliSENS) and reference technique (Amplicor) using whole blood or DBS. And viral load comparison was also showed a high correlation and a good concordance between the different viral load techniques and confirms that Nuclisens under quantifies some CRF02_AG samples, which is predominant in Senegal.

Key Word: HIV, HBV, Genetic diversity and comparison of techniques**Ecole Doctorale : Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement (ED-SEV)****Formation : Génétique des populations**