

**UNIVERSITES: CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLES DOCTORALES: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE
ET DE L'ENVIRONNEMENT (SEV)
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUE**

Année : 2013

N^o d'ordre: 60

THESE de DOCTORAT ès SCIENCES



Spécialité: Génétique des Populations

Présentée par

Nafissatou Leye

Titre:

**Le VIH-1 au Sénégal: Résistance et Diversité génétique
dans la Population Générale et chez les Hommes ayant
des rapports Sexuels avec d'autres Hommes**

Soutenue publiquement le 19/12/2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE:

Président	Meissa TOURE	Professeur, Faculté de Médecine UCAD
Examineur	Souleymane MBOUP	Professeur, Faculté de Médecine UCAD
	Bara Ndiaye	Professeur, Faculté de Médecine UCAD
Rapporteurs	Laurent BELEC	Professeur, Université Paris V
	Cheikh Tidiane NDOUR	Professeur, Faculté de Médecine UCAD
	Babacar FAYE	Maitre de Conférence Agrégé, UGB
Directeurs de thèse	Eric DELAPORTE	Professeur, Université Montpellier 1
	Coumba TOURE-KANE	Professeur, Ecole polytechnique UCAD

Résumé

Avec le développement de l'accès aux antirétroviraux (ARVs), l'émergence de la résistance devient inévitable et peut maintenir la forte réplication virale qui participe à la grande diversité génétique du VIH. La transmission de cette résistance peut compromettre l'efficacité des ARVs. Il est donc important de surveiller la résistance et la diversité génétique des souches. Nos travaux sur la résistance transmise du VIH-1 dans la population générale (PG) au Sénégal ont montré que la circulation de souches résistantes chez des patients naïfs d'ARVs était faible (inférieure à 5%) et stable entre 1998 et 2007. L'étude de la résistance acquise sous première ligne de traitement ARV dans la région de Dakar a montré un taux de succès virologique de 81,4% (CV<50 copies/ml). L'échec virologique (CV≥1000 copies/ml) variait entre 3,7% et 16,7% à travers les sites de suivi et était de 7,9% à M12 et 10,7% à M24. La fréquence de résistance parmi les patients en échec était de 77,4% à M12 et 80,8% à M24 avec une sélection majoritaire des mutations M184V et la K103N. Par ailleurs, dans le groupe des Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes (HSHs) au Sénégal, l'étude sur les doubles infections a suggéré qu'au moins 31,9% à 36,2% étaient infectés par plus d'une souche du VIH-1. Elle a aussi confirmé le brassage des variants du VIH-1 entre les femmes à faible risque d'infection et les HSHs. Enfin, l'étude de l'origine du sous-type C a montré que plusieurs introductions ont eu lieu dans la PG avec un ancêtre commun daté au début des années 1970. Cependant chez les HSHs, l'introduction est unique et l'ancêtre commun estimé au début des années 1980. Globalement, nos travaux ont montré des résultats satisfaisants sur l'efficacité des ARV dans les sites étudiés. Ils fournissent des informations nécessaires à l'amélioration des stratégies thérapeutiques afin de prévenir les échecs. Ils démontrent aussi la nécessité d'améliorer les programmes de prévention ciblant les populations clés.

Mots clés: VIH, Résistances, population-générale, diversité-génétique, doubles infections, HSHs,

TITLE: HIV-1 in Senegal: Resistance and genetic diversity in general population and men having sex with men

Abstract

The expanding access to antiretroviral drugs makes the emergence of HIV resistance inevitable, which can maintain high viral replication and participate to the high HIV genetic diversity. Transmission of resistant viruses to an ARV-naive patient reduces the effectiveness of first-line ARV treatment and increases the need to switch to second-line regimens. It is therefore important to monitor resistance and genetic diversity of strains. Our work on HIV-1 transmitted drug resistance in general population (GP) in Senegal showed a low (less than 5 %) circulation of resistant strains within naive patients and stable between 1998 and 2007. The study of acquired drugs resistance under first line ARV treatment as recommended by WHO in the Dakar region showed a virological success rate of 81.4% (CV<50 copies/ml). Virological failure (CV ≥1000 copies/ml) varied between 3.7% and 16.7% across study sites and was 7.9% at M12 and 10.7% at M24. From these cases, frequency of resistance was 77.4% at M12 and 80.8% at M24 and resistance mutations mostly selected were M184V and K103N. Furthermore, in key population of Men having Sex with Men (MSM) in Senegal, the study of HIV-1 dual infections has suggested that at least 31.9% to 36.2% were infected with more than one HIV-1 strain. It also confirmed the inter-mixing of HIV-1 variants among low risk women and MSM. Finally, the study of the origin of subtype C showed that multiple introductions of this variant occurred in the general population (GP) with a common ancestor in the early 1970s. However in MSM, a single introduction was found, from a common ancestor estimated in the early 1980s. In conclusion, our studies has shown satisfactory results on the effectiveness of ART in Senegal and provided necessary information for improved therapeutic strategies to prevent failures. They also demonstrated the need to monitor HIV variants between PG and MSM and to improve efforts to support prevention programs targeting key populations.

Key Words: HIV, Resistance, General-population, genetic-diversity, Dual-infections, MSMs,

Discipline: Biologie moléculaire (Virologie)

Laboratoire: Bactériologie-virologie, HALD, 30 Avenue Pasteur, BP 7525 Dakar-Sénégal/

UMI233-SIDA et maladies associées, IRD, 911 Avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier, France

REMERCIEMENTS

C'est pour moi un réel plaisir de remercier et de témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui, de près ou de loin, ont permis d'accomplir ces travaux de thèse.

Je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude au **Professeur Souleymane Mboup**, examinateur de ce travail, qui, en sa qualité de directeur du L'BV, n'a ménagé aucun effort pour m'accueillir dans son laboratoire. Votre simplicité, votre très grande modestie forge l'admiration de l'ensemble des jeunes chercheurs. Permettez-moi, de vous témoigner ici mes remerciements les plus respectueux.

- Je tiens à exprimer ma gratitude à mes deux directeurs de thèse:

Le **Professeur Coumba Toure-kane**, mon encadreur à l'UCAD-Dakar qui a guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche. Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez apportée vos compétences et votre soutien moral et en moyens durant cette thèse. Veuillez accepter l'expression de mes remerciements et de ma gratitude. Puisse ce travail répondre à vos attentes et être le témoignage de ma reconnaissance. Merci aussi pour les blagues et les taquineries!

Le **Professeur Eric Delaporte**, mon encadreur à l'UMI-Montpellier pour l'accueil, la confiance que vous m'avez accordée dès mon arrivée à Montpellier. Vous vous êtes investi en temps et en moyens pour que mon séjour et mon travail se fassent dans de bonnes conditions. Permettez-moi de vous témoigner ici mes remerciements les plus respectueux et puisse ce travail répondre à vos attentes.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail:

Au Pr Meïssa Touré, de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Aux Professeurs Laurent Belec, Cheikh Tidiane Ndour et Babacar Faye qui ont examiné ce travail et apporté leurs commentaires en tant que rapporteurs malgré leurs nombreuses occupations durant cette fin de l'année. Soyez tous assurés de ma gratitude et de mon profond respect.

Je reste reconnaissant au **Docteur Martine Peeters**, pour son encadrement efficace et surtout sa disponibilité aux différentes étapes de ce travail à l'UMI 233 à Montpellier. Votre rigueur scientifique et votre œil critique nous ont été très précieux pour structurer et améliorer le travail. Puisse ce travail être le témoignage de ma reconnaissance.

Je tiens à remercier spécialement le **Docteur Nicole Vidal**. C'est avec passion que vous m'avez encadrée durant cette thèse. Je retiens de toi un encadreur dont la rigueur scientifique coexiste avec des qualités humaines extraordinaires. Je tiens à vous remercier et à vous témoigner toute ma reconnaissance pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt que vous m'avez faite vivre durant mes séjours au sein de l'UMI 233. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Ma reconnaissance va aussi à tout le personnel du laboratoire de **Bactériologie-Virologie** de l'Hôpital Aristide le Dantec avec une mention particulière au personnel **Enthousiaste et aimable de l'unité de Biologie Moléculaire** qui a partagé avec moi les joies et le stress du labo: **Halimatou, Sada, Oumy, Ndeye Amy, Ousseynou, Amina, Diouara, Moussa, Edmond, Khady, Bouso, Daouda, Yao, Malick, Fatou, Aïssatou, Zahra, Safiétou, Diabou, Fatima, Dior, Ambroise...**

Ma gratitude va également à tous les membres du laboratoire **Rétrovirus à l'IRD de Montpellier** qui ont travaillé à un moment, de près ou de loin, sur cette thèse: **Steve, Ahidjo, Céline, Matthieu, Lucie, Marjorie, Amandine, Fatima, Sabrina, Christelle, Sophie, Coralie, Barbara, ...** pour leur gentillesse, soutien et contribution à différents niveaux de réalisation de ce travail. Merci à toutes et à tous!

Mes très sincères remerciements à tous nos **partenaires et collaborateurs** durant cette thèse, particulièrement du **CTA, CRCF et maladies infectieuses de Fann**, du **CPS**, médecine interne et dermatologie de **HALD** ainsi que de l'ensemble des sites de prise en charge à Dakar.

Je reste reconnaissant au service de coopération et d'actions culturelles (**SCAC**) de l'**Ambassade de France** à Dakar, qui m'a octroyé la bourse d'étude qui m'a permis d'effectuer mes séjours à Montpellier.

Enfin merci à tous mes amis (**Khady, Fatima, Adama, Maty, Kiné, Djibril, Mamadou, Zal, Sembène, Kayré, Maréma...**) pour leur présence et leur soutien de chaque instant.

Je dédie ce travail

A mon père Mansour Leye et à ma mère Mbénda Fall pour l'affection et la confiance que vous m'avez témoigné durant toutes ces années, lors de tous mes choix. Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous. Vous m'avez toujours appris que face à ce plus long des combats qui est la vie, le courage, la patience et la détermination sont les meilleures armes pour faire face à la crainte de l'inconnu et de demain: Que Dieu vous protège et vous accorde longue vie.

A mon très cher et tendre mari Omar qui depuis plus de 3 ans me comble de son amour, de son soutien, de son réconfort, de sa patience et de sa présence dans les meilleurs moments comme dans les plus difficiles... Tu m'as appris à surmonter les difficultés et m'as toujours tenu la main pour passer cette houle de la thèse... Merci de partager tout cela avec moi.

A mes frères et sœurs Ndeye, Omar, Pape, Sanou, Aïda, Marème, Ngagne, Mbénda, Seyni, Soda, Thérèse et particulièrement à ma Souffre-douleur Diatou qui a toujours été à mes côtés durant toutes les étapes de cette thèse et qui m'a permis, parfois un peu à ses dépens, d'évacuer mon trop plein d'énergie et de stress.

A ma belle-famille et particulièrement à Pa Diouf et maman Faya, Mame, Bineta, Khary, Mamy... pour le soutien, l'encouragement et les prières formulées à mon égard.

A toutes les PVVH que j'ai rencontré et côtoyé dans mes périples à travers Dakar. A leur endroit, je formule le vœu de la mise au point d'un traitement à la fois curatif et préventif du mal avec lequel elles vivent au quotidien.

A tous ceux qui ont contribué de manière directe ou indirecte à la réalisation de ce travail.

A Tous



Abréviations

ABC:	Abacavir
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
aLRT :	approximative Likelihood Ratio Test
ALT:	Asymptomatique à Long Terme
ANRS:	Agence Nationale de Recherches sur le SIDA
APOBEC:	Apolipoprotein B mRNA-editing, Enzyme-Catalytic, polypeptide-like
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ARV:	Antirétroviraux
ATV/r:	Atazanavir boosté par le ritonavir
AZT:	Azidotimine, Zudovidine
CCR5:	CC chemokine Receptor type 5, récepteur de chimiokines 5
CD4/CD8 :	Classe de Différenciation 4/Classe de Différenciation 8
CDC:	Center for Diseases Control
CNLS:	Conseil National de Lutte contre le SIDA
CPS:	Centre de Promotion de la Santé
CRCF:	Centre de Recherche Clinique et de Formation
CRF:	Circulating Recombinant Forms, formes recombinantes circulantes
CSW:	Commercial Sex Workers
CTA:	Centre de Traitement Ambulatoire
CTL:	Lymphocytes T Cytotoxiques
CV:	Charge Virale
CXCR4:	CXC chemokine receptor type 4, récepteur de chimiokines 4
DC-SIGN:	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin
DDI:	Didanosine
dNTP:	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
EDSV-MICS:	Enquête Démographique et de Santé à Indicateurs Multiples au Sénégal
EFV:	Efavirenz
ENSC:	Enquête Nationale de Surveillance Combinée
env:	enveloppe
ETR:	Etravirine
FDA:	Food and Drug Administration
FSW:	Female Sex Workers
gag:	group-specific antigen, gènes des antigènes de groupe
GP:	Glycoprotéine
GTR:	General Time Reversible
HAART:	Highly Active Antiretroviral Treatment
HALD:	Hôpital Aristide Le Dantec
HLA:	Human Leucocyte Antigen
HPD:	Hôpital Principal de Dakar
HRB:	Hôpital Roi Beaudouin
HR1/HR2:	Heptad Repeat 1/2

HSHs:	Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes
HTLV-1/2:	Human T cell Leukemia Virus type 1/2
IAS:	International AIDS Society
IHS:	Institut d'Hygiène Sociale
IN:	Intégrase
INTI:	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
INNTI:	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP:	Inhibiteurs de la Protéase
IRD:	Institut de Recherche pour le Développement
ISAARV:	Initiative sénégalaise d'accès aux antirétroviraux
IST:	Infections Sexuellement Transmissibles
LAV:	Lymphadenopathy Associated Virus
LBV:	Laboratoire de Bactériologie-virologie
LPV/r:	Lopinavir boosté par le ritonavir, Kalétra
LT:	Lymphocytes T
LTCD4:	Lymphocytes T CD4
LTR:	Long Terminal Repeats
MDC:	Mutations du Domaine de Connexion
MHA:	Multi-region Hybridization Assay
MI:	Maladie Infectieuse
MRCA:	Most recent common ancestor, Ancêtre commun le plus récent
MSMs:	Men having Sex with Men
Nef:	Facteur de Régulation Négatif
NVP:	Névirapine
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
ONG:	Organisme Non Gouvernemental
ONUSIDA:	Organisation des Nations Unies pour la lutte contre le SIDA
OTU:	Operational Taxonomic Unit
P17 MA:	Protéine de Matrice de poids moléculaire 17 Daltons
P24 CA:	Protéines de capsid de poids moléculaire 24 Daltons
pb:	paire de bases
PBMC :	Peripheral blood mononuclear cell
PCR :	Polymerase chain reaction
PEC:	Prise En Charge
PG	population générale
PMS:	Centre de santé Philip Maguilène Senghor
PNH:	Primate non humain
PNLS :	Programme National de Lutte contre le SIDA.
pol:	Polymerase
PR:	Protéase
PS:	Professionnelle du Sexe
PTME :	Prévention de la Transmission Mère-Enfant
PVVIH:	Personne Vivant avec le VIH
RCA:	République Centre Africaine
RDC:	République Démocratique du Congo
Rev:	Régulateur de l'Expression des protéines Virales

RNA:	Ribonucleic acid
RNase H:	Ribonucléase H
RPV:	Rilpivine
RT:	Reverse transcriptase (transcriptase inverse)
RT-PCR :	Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction
SGA:	Single Genome Amplification (Amplification de molécules uniques)
SIDA:	Syndrôme d'Immunodéficience Acquise
SIV:	Simian Immunodeficiency Virus ; virus de l'immunodéficience simienne
TAM:	Thymidine analogue mutations, mutations aux analogues de la thymidine
Tat:	Trans-Activateur de la Transcription xiv
TB:	Tuberculose
TAR :	Traitement anti-rétroviral
TDF:	Ténofovir
TI:	Transcriptase inverse
UCAD:	Université Cheikh Anta Diop de Dakar
UDI:	Usagers de Drogues Injectables
UMI:	Unité Mixte Internationale
UM1:	Université de Montpellier 1
UNAIDS:	United Nations of AIDS
URF:	Unique Recombinant Form, forme recombinante unique
VAD:	Visite A Domicile
<i>vif</i> :	virion infectivity factor
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vpr :	Viral protein r
Vpu:	Viral protein u
Vpx:	Viral protein x
3TC:	Lamuvudine

Table des matières

Remerciements.....	3
Dédicaces.....	5
Abréviations.....	6
Table des Matières.....	9
Liste des figures.....	12
Liste des Tableaux.....	13
Contribution.....	14
Introduction générale.....	15
Rappels Bibliographiques	17

Chapitre I: Le Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH)18

I.1. Définition et Classification du VIH.....	18
I.2. Historique et origine du VIH.....	18
1.2.1. Historique du VIH.....	18
1.2.2. Origine du VIH.....	19
1.2.2.1. Origine du VIH-1.....	19
1.2.2.2. Origine du VIH-2.....	21
I.3. Morphologie, structure et organisation génomique du VIH.....	22
1.3.1. Morphologie et structure.....	22
1.3.2. Organisation génomique du VIH.....	23
I.4. Le cycle de réplication du VIH.....	27
1.4.1. L'étape de fixation et d'entrée du virus dans la cellule hôte.....	28
1.4.2. La transcription inverse et l'intégration au génome cellulaire.....	28
1.4.3. L'expression des gènes et l'assemblage du virus.....	28
1.4.4. Le bourgeonnement du virion et sa maturation.....	29

Chapitre II: Épidémiologie du VIH.....30

II.1. Épidémiologie globale du VIH dans le monde.....	30
II.2. Épidémiologie du VIH en Afrique	31
II.3. Épidémiologie dans les groupes vulnérables	33

Chapitre III : La Diversité génétique du VIH.....36

III.1. Causes de la variabilité génétique.....	36
III.2. Les variants génétiques du VIH.....	38
III.2.1. Diversité des variants du VIH-1.....	39
III.2.1.1 Le groupe M du VIH-1 (Major).....	39
III.2.1.2. Les autres groupes du VIH-1.....	40
III.2.2. La diversité génétique du VIH-2.....	41
III.3. Répartition globale des variants du VIH-1 groupe M	42
III.3.1. Fréquences des sous-types et CRFs dans le monde.....	42
III.3.2. Distribution globale des différents variants	43
III.3.2.1. Répartition en Afrique.....	43

III.3.2.2. Répartition dans les autres continents.....	45
III.3.3. Distribution des variants génétiques chez les HSHs.....	46
III.5. Conséquence et implication de la diversité génétique du VIH.....	47
III.5.1. Conséquences sur la progression et la transmission de la maladie.....	47
III.5.2. Impact de la diversité sur le diagnostic et le suivi des PVVIHs.....	48
III.5.3. Conséquences de la diversité sur le traitement ARV.....	49
III.5.4. Impact de la diversité sur la recherche vaccinale.....	50
III.6. Quelques outils de détermination et d'analyse de la diversité génétique du VIH.....	51
III.6.1. Le Séquençage nucléotidique et la phylogénie permet de déterminer les variants majoritaires.....	51
III.6.1.1. Le séquençage.....	51
III.6.1.2. Analyses phylogénétiques.....	51
III.6.2. Les nouvelles techniques permettent d'étudier les variants minoritaires.....	53
III.6.2.1. La Multi-Hybridization Assay (MHA).....	53
III.6.2.2. La SGA permet d'isoler les séquences des variants minoritaires.....	54
III.6.2.3. Le pyroséquençage, une autre méthode d'études des variants minoritaires.....	55
III.7. Physiopathologie de l'infection à VIH/SIDA.....	56

Chapitre IV: Le traitement antirétroviral et résistance du VIH aux ARVs.....	58
---	-----------

IV.1. Classes et mécanismes d'action des ARVs.....	58
IV.1.1. Les inhibiteurs de la Transcriptase Inverse (TI).....	58
IV.1.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la RT (INTI).....	58
IV.1.1.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la TI (INNTI).....	59
IV.1.2. Les inhibiteurs de la Protéase (IP).....	61
IV.1.3. Les nouvelles classes antirétrovirales.....	61
IV.1.3.1. Les inhibiteurs de l'entrée du virus dans sa cellule cible.....	61
IV.1.3.2. Les inhibiteurs de l'intégrase du virus.....	62
IV.1.3.3. Les inhibiteurs de maturation.....	62
IV.2. Traitement ARV dans les pays à ressources limitées : recommandations de l'OMS.....	63
IV.3. L'échec thérapeutique.....	65
IV.4. Les résistances du VIH aux antirétroviraux.....	66
IV.4.1. Résistances du VIH aux INTI.....	67
IV.4.2. Résistances du VIH aux INNTI.....	68
IV.4.3. Résistances du VIH aux IP.....	70
IV.4.4. Résistances du VIH aux inhibiteurs d'entrée.....	70
IV.4.5. Résistances du VIH aux IN.....	71
IV.5. Méthodes d'étude de la résistance.....	71
IV.5.1. Test phénotypique de résistance.....	71
IV.5.2. Test génotypique de résistance.....	72
III.5.3. Interprétation des tests génotypiques de résistance.....	73

Chapitre V. L'infection à VIH au Sénégal.....	74
--	-----------

V.1. Présentation du Pays.....	74
V.2. Aperçu de l'infection à VIH au Sénégal.....	75
V.2.1. Prévalences du VIH dans la population générale.....	75
V.2.2. Le VIH-2 au Sénégal.....	76
V.2.3. Prévalences du VIH dans les populations clés.....	76
V.3. Prise en charge des personnes vivant avec le VIH au Sénégal.....	77
V.3.1. Décentralisation de la prise en charge et augmentation de la mise sous ARV.....	77

V.3.2. Le suivi immuno virologique.....	79
---	----

TRAVAUX DE THESE.....	81
------------------------------	-----------

I. Contexte et objectif de la thèse.....	82
---	-----------

II. Cadres et lieux de l'étude.....	83
--	-----------

Chapitre I. Etude de la résistance transmise du VIH-1 aux antirétroviraux chez des patients naïfs de traitement au Sénégal.....	85
--	-----------

I.1. Introduction.....	85
I.2. Méthodologie.....	85
I.3. Présentation des résultats.....	88
I.4. Conclusion.....	89

Chapitre II. Evaluation des réponses virologiques et de la résistance acquise à 12 et 24 mois de traitement ARV à Dakar.....	95
---	-----------

II.1 Introduction.....	95
II.2. Méthodologie.....	95
II.3. Résultats.....	96
II.4. Conclusion.....	100

Chapitre III. Fréquence élevée de doubles infections du VIH-1 avec des sous-types et CRFs différents ou identiques chez les HSHs au Sénégal.....	101
---	------------

III.1. Introduction.....	101
III.2. Méthodologie.....	101
III.3. Présentation des résultats.....	105
III.4. Conclusion.....	106

Chapitre IV. Origine géographique et temporelle du sous-type C du VIH-1 au Sénégal.....	116
--	------------

IV.1. Introduction.....	116
IV.2. Méthodologie.....	116
IV.3. Présentation des résultats.....	117
IV.4. Conclusion.....	119

Discussion générale.....	132
---------------------------------	------------

Conclusion.....	139
Recommandations.....	140
Perspectives.....	140
Valorisation de la thèse.....	141
Références bibliographiques.....	143

Liste des figures

Figure 1. Diversité génétique des VIHs et SIV et chaîne de transmission inter-espèce.....	20
Figure 2. Origine géographique du VIH-2.....	21
Figure 3. Structure du VIH.....	23
Figure 4. Organisation génomique des VIHs.....	23
Figure 5. Cycle de réplication du VIH.....	27
Figure 6. Prévalences de VIH chez les HSHs par rapport à la population générale dans certains pays.....	35
Figure 7. Schéma de la recombinaison génique.....	37
Figure 8. Arbre phylogénétique montrant les groupes du VIH-1.....	39
Figure 9. Représentation schématique des CRF01_AE, CRF02_AG et CRF04_cpx.....	40
Figure 10. Répartition des variants de VIH-1 M entre 2000 et 2007.....	43
Figure 11. Distribution globale des sous-types et CRFs du VIH-1 dans le monde.....	44
Figure 12. Epidémiologie moléculaire des sous-types/CRFs du VIH-1 chez les HSHs, 2007-2011.....	46
Figure 13. Les différentes phases d'évolution du VIH.....	56
Figure 14. Cibles du traitement antirétroviral selon le cycle de réplication.....	58
Figure 15. Nombre d'adultes et d'enfants bénéficiant d'une thérapie antirétrovirale dans les pays à revenu faible et intermédiaire 2003–2012.....	65
Figure 16. Mutations associées à la résistance au niveau de la TI.....	69
Figure 17. Carte du Sénégal montrant les 14 régions.....	74
Figure 18. Evolution du nombre de sites de prise en charge de 2002 à 2011 au Sénégal.....	78
Figure 19. Protocoles de première et seconde ligne de traitement ARV chez l'adulte et l'adolescent au Sénégal.....	79
Figure 20. Carte de la région de Dakar, localisant les sites d'inclusion.....	86
Figure 21. Répartition des réponses virologiques à M12 et M24 de TAR à Dakar.....	97
Figure 22. Taux d'échec virologique dans les sites de recrutement.....	97
Figure 23. Prévalences des mutations de résistance à M12 et M24.....	99
Figure 24. Portion d'alignement de la zone d'hybridation de la sonde vpuA3.....	102

Liste des tableaux

Tableau I. Données globales et régionales sur l'infection à VIH en 2011.....	30
Tableau II. Estimation de la prévalence de VIH chez les adultes de 15-49 ans en Afrique Sub-saharienne en 2011.....	32
Tableau III. Liste des antirétroviraux actuellement approuvée par la FDA.....	60
Tableau IV. Prévalences régionales du VIH au Sénégal.....	76
Tableau V. Amorces utilisées pour le génotypage des patients.....	87
Tableau VI. Profils des mutations chez les patients résistants aux traitements de première ligne.....	98

Contribution

J'ai effectué ces travaux de recherche sous la supervision de mes encadreurs au laboratoire de bactériologie-virologie de Dakar et l'UMI233 de Montpellier.

La première étude sur la résistance primaire a été effectuée conjointement avec Dr Halimatou Diop-Ndiaye. Après la collecte des échantillons de patients naïfs de 2007, j'ai réalisé leur acheminement au laboratoire, effectué une partie de la séparation lymphocytaire (cas où je retournais des sites après l'heure de descente des techniciens) toutes les extractions d'ARN, les amplifications, et le séquençage.

J'ai aussi réalisé l'acheminement au laboratoire d'une partie des prélèvements et questionnaires de patients sous première ligne. Par ailleurs, j'ai aussi réalisé une partie des quantifications de la charge virale, toutes les extractions, amplifications et séquençages.

Pour l'étude sur les doubles infections, effectuée sous la responsabilité de Nicole Vidal, j'ai réalisé une partie des séquences et de la MHA dans la région *vpu*, ainsi que l'ensemble des MHA et des séquences dans *gag p17* et les SGA.

L'étude sur l'origine du sous-type C au Sénégal a été réalisée avec Dr Matthieu Jung, bio-informaticien. J'ai participé à la préparation des données par l'élimination d'une partie des séquences sous la supervision de Nicole Vidal. J'ai aussi réalisé le séquençage des 18 nouvelles séquences *pol* du Sénégal incluses dans l'analyse.

Introduction générale

Depuis l'identification du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) au début des années 80, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) demeure toujours l'un des défis sanitaires les plus importants à travers le monde. Très vite considérée comme un réel problème de santé, l'infection à VIH s'est avérée aussi un obstacle au développement. Malgré l'augmentation du financement de la recherche, le renforcement de l'engagement politique et les progrès accomplis pour élargir l'accès aux traitements anti-VIH, l'épidémie ne cesse d'avancer à l'échelle mondiale. Trente ans après sa description, et bien que le taux annuel de nouvelles infections continue de chuter à l'échelle mondiale, dans certaines régions, les épidémies nationales continuent de progresser.

Grace à la thérapie antirétrovirale, la vision de l'infection à VIH/SIDA a largement changé. Aujourd'hui, grâce à l'association de plusieurs médicaments (HAART comme Highly Active Antiretroviral Treatment), l'infection à VIH/SIDA est devenue une maladie chronique. En attendant un vaccin efficace, il existe aujourd'hui des ARVs qui ont permis d'améliorer l'état de santé des patients infectés par le VIH, de diminuer considérablement leur taux de mortalité et d'augmenter leur espérance de vie (May *et al.*, 2011). Le traitement ARV est désormais reconnu pour éviter la transmission du VIH, en réduisant la charge virale et par conséquent, le risque de transmission (Williams *et al.*, 2011).

Au cours de ces dernières années, l'accès élargi au traitement antirétroviral (TAR) dans les pays à ressources limitées est devenu une priorité de santé internationale. Grâce à l'action combinée des gouvernements, organismes non gouvernementaux et autres formes de soutiens, l'accès aux ARVs s'est considérablement élargi. L'augmentation du nombre de personnes sous traitement ARV est plus spectaculaire en Afrique subsaharienne, région la plus durement touchée par le VIH. Dans ces pays à ressources limitées, des manques d'infrastructures, des ruptures de stock, une gestion inappropriée des effets secondaires entre autres, constituent un ensemble d'obstacles pouvant compromettre le traitement et maintenir la réplication virale.

Du fait de la forte réplication du VIH, la pandémie est 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 les doubles infections et la sélection de souches résistantes au traitement antirétroviral. Le continent Africain est l'épicentre d'une très grande diversification du VIH avec la présence de tous les sous-types et de nombreux recombinants.

Par ailleurs, depuis que les premiers cas de SIDA ont été décrits parmi les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSHs), ils constituent un groupe vulnérable quel que soit le pays, avec des prévalences de VIH beaucoup plus élevées que chez les hétérosexuels.

Au Sénégal, pays à ressources limitées, la lutte contre le VIH a été très tôt traitée comme une priorité nationale. L'épidémie de VIH y est concentrée, avec une faible prévalence dans la population générale (0,7%) et assez élevée chez les populations clés, les plus exposées aux risques: 21,8% chez les Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes et 18,5% chez les professionnelles du sexe (PS) en 2010 (CNLS-Sénégal, 2012). Après l'annonce du succès du traitement ARV en 1996, le gouvernement du Sénégal était l'un des premiers pays de l'Afrique Subsaharienne à mettre en place une initiative gouvernementale dénommée Initiative Sénégalaise d'Accès aux ARV (ISAARV) en 1998. Ce programme fut étendu progressivement à l'ensemble du territoire en 2001 et a été renforcé par la gratuité des ARV décrétée en 2003. Une conséquence majeure de l'accès élargi aux traitements pourrait être l'émergence rapide et incontrôlée de souches résistantes pouvant compromettre l'efficacité des molécules disponibles dans le pays. Aussi, la grande diversité génétique du VIH pourrait avoir plusieurs conséquences sur le diagnostic, la pathogénicité et le traitement déjà limité dans les pays du sud.

Des études étaient alors nécessaires pour évaluer l'efficacité du traitement ARV dans un contexte de vie réelle ainsi que pour documenter l'ampleur de la diversité génétique des souches de VIH-1 dans les populations clés, surtout dans les régions où circulent plusieurs sous-types et formes recombinantes comme le Sénégal.

C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse ont été entrepris pour documenter les résistances et la diversité génétique du VIH-1 dans la population générale et chez les HSHs au Sénégal. Ce travail sera abordé comme suit: après quelques rappels bibliographiques sur le VIH/SIDA, nous allons exposer nos travaux de thèse, discuter les résultats obtenus avant de faire une conclusion et d'annoncer les recommandations et perspectives qui en découlent.

Rappels bibliographiques

Chapitre I: Le Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH)

I.1. Définition et Classification du VIH

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* définis par un mode de répllication passant par une étape de rétro-transcription de leur ARN en ADN. Pour se multiplier, le VIH a besoin de rétro-transcrire son ARN en ADN pour pouvoir l'intégrer dans le génome de la cellule hôte dont il détourne le fonctionnement. Selon l'évolution phylogénétique, les rétrovirus sont classés en sept genres incluant les *Lentivirus* (Coffin, 1992). Ces derniers infectent principalement les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes T CD4⁺). Les infections lentivirales causées par le VIH résistent aux attaques du système immunitaire et causent généralement des immunodéficiences sur des périodes relativement longues (pouvant atteindre dix ans) avant l'apparition de symptômes cliniques identifiables et l'état de maladie. Le patient infecté peut conserver le virus en permanence depuis la primo-infection et jusqu'aux stades avancés de la maladie (Coffin, 1992).

I.2. Historique et origine du VIH

1.2.1. Historique du VIH

C'est en 1981 que le CDC (Center for Disease Control and Prevention) d'Atlanta avait rapporté quelques cas d'une forme rare de pneumonie touchant spécifiquement des jeunes hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSHs). En 1983, à partir de ganglions d'un patient présentant une lymphadénopathie, un rétrovirus fut isolé par l'équipe du Professeur Luc Montagnier (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Il fut dénommé lymphoadenopathy associated virus (LAV) et ses caractéristiques se révélèrent proches de celles du Human T cell Lymphotropic Virus (HTLV), découvert en 1984 aux Etats-Unis chez des patients atteints de SIDA et chez des homosexuels (Sarngadharan *et al.*, 1984). Cette même année, l'équipe de Levy à San Francisco isolait le virus nommé Acquired Immunodeficiency Syndrome Related virus (AIDS Related Virus) (Levy *et al.*, 1984). En 1985, une commission scientifique propose une nomenclature commune: le virus responsable du SIDA fut alors appelé Virus de l'Immunodéficience Humaine (Ratner *et al.*, 1985).

Cette même année en 1985, l'existence d'un autre rétrovirus fut mise en évidence sur des prélèvements de professionnelles du sexe (PS) sénégalaises. En 1986, ce deuxième virus fut isolé par l'équipe du Pr. Montagnier chez deux malades d'origine portugaise ayant longtemps séjournés en Afrique de l'Ouest, et qui aussi présentaient un SIDA. Ce virus apparenté au VIH présentait des propriétés structurales, génétiques et biologiques similaires. Cependant, il était différent au niveau de ses protéines de surface. Il fut alors appelé Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2 (VIH-2) et l'archétype isolé en 1983 fut renommé VIH-1 (Barin *et al.*, 1985).

I.2.2. Origine du VIH

I.2.2.1. Origine du VIH-1

Depuis la découverte du VIH dans les années 80, son origine est le sujet d'intenses débats entre les scientifiques. En 1985, la découverte chez les macaques d'un virus causant des signes cliniques semblables à ceux du VIH (Daniel *et al.*, 1985) a orienté les réflexions vers une provenance de primates non humains. En 1989, l'isolement de premières souches de SIVcpz (SIVcpzGAB1 et SIVcpzGAB2) chez deux chimpanzés captifs mais nés en milieu sauvage au Gabon fut le premier élément indicateur de l'origine du virus de l'immunodéficience humaine. En 1992, un autre virus (SIVcpzANT) est identifié chez un chimpanzé provenant de la RDC. Ainsi, le VIH-1 a-t-il été soupçonné de provenir à l'origine de chimpanzés (Gao *et al.*, 1999).

Cependant, bien que ces découvertes constituaient une avancée dans la recherche de l'origine, elles n'établissaient pas avec certitude la nature exacte du réservoir chimpanzé du VIH, car ceci nécessitait une analyse sur un nombre d'animaux sauvages plus important dans leur milieu naturel.

En 2002, une méthode non invasive de collecte et de stockage de <féces> et d'urines a été mise au point pour extraire les acides nucléiques contenus dans ce matériel. Cette technique a ouvert la voie à l'identification et à la caractérisation des SIV des grands singes et a permis la caractérisation des SIVcpz de *P.t. schweinfurthii* sauvages en RDC et en Tanzanie (Santiago *et al.*, 2003; Worobey *et al.*, 2004). Cependant, des analyses phylogénétiques ont montré que ces séquences formaient une lignée éloignée de celle du VIH-1.

Par ailleurs, les sous-espèces *Pan troglodytes troglodytes* et *Pan troglodytes schweinfurthii* ont été identifiées comme hôtes naturels du SIVcpz et le SIVcpz du *Pan troglodytes troglodytes* était très proche des souches HIV-1 (Santiago *et al.*, 2002; 2003). Ce qui signifie que le VIH-1 serait le résultat d'une transmission zoonotique (figure 1) du SIVcpz du *P. t. troglodytes* du chimpanzé à l'homme (Gao *et al.*, 1999). Des études réalisées en 2006 ont montré que les SIVcpzPtt infectant les chimpanzés de la sous-espèce *troglodytes* du Cameroun étaient les réservoirs des VIH-1 groupe M et N (Keele *et al.*, 2006).

Au cours de la même année, le SIVgor avait été identifié chez des gorilles de la sous-espèce *Gorilla gorilla* du Cameroun (Van Heuverswyn *et al.*, 2006). Les SIVgor sont proches du VIH-1 groupe O (Takehisa *et al.*, 2009) mais la distance génétique entre les séquences des virus est trop grande pour justifier une relation zoonotique directe. En 2009, une nouvelle souche de VIH-1 (le groupe P) encore phylogénétiquement beaucoup plus proche du SIVgor (Plantier *et al.*, 2009) a été décrite au Cameroun, suggérant qu'il aurait pu être transmis à l'homme par les gorilles. La figure 1 ci-dessous montre les relations phylogénétiques entre les souches de VIH et de SIV.

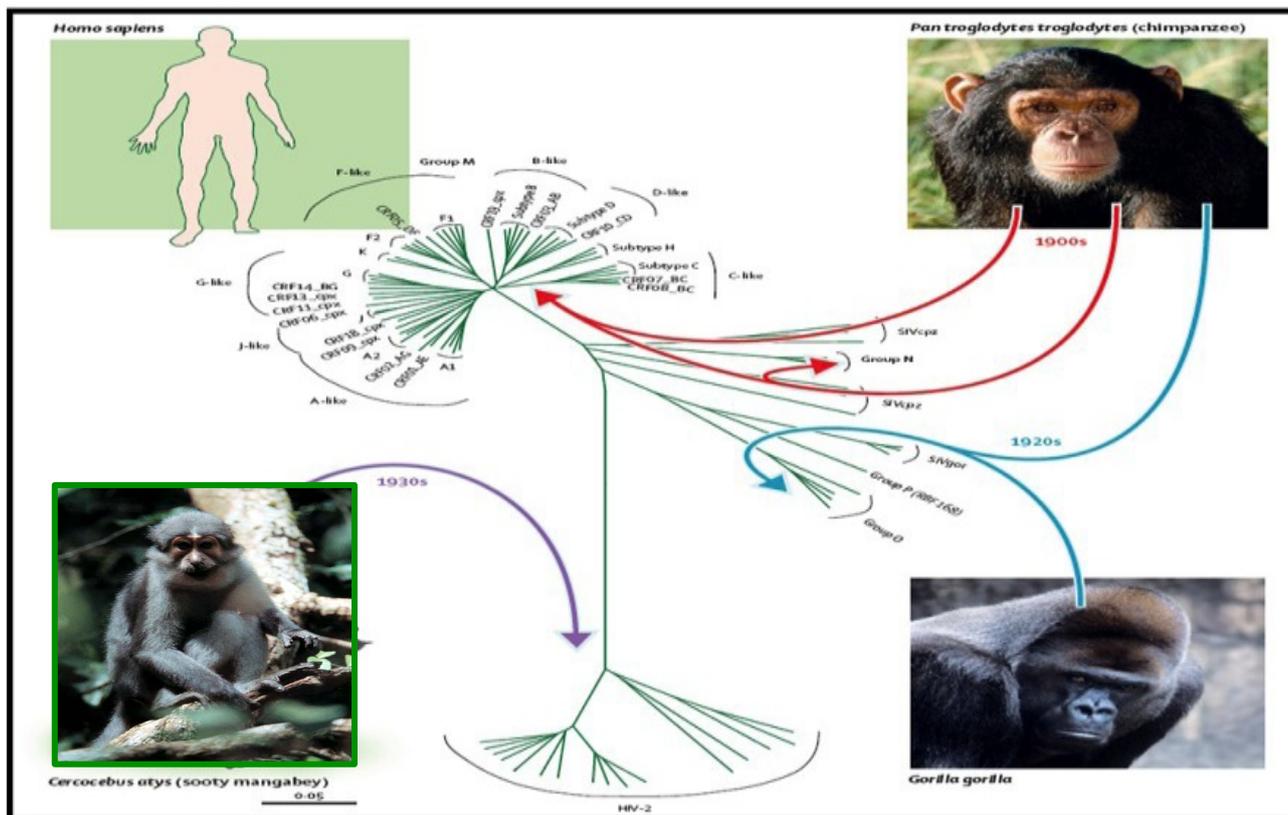


Figure 1. Diversité génétique des VIHs et SIV et chaîne de transmission inter-espèce
 (Adapté de Tebit et Arts, 2011)

Les réservoirs des VIH-1 ayant été identifiés en Afrique centrale, plus précisément au Cameroun, il est donc très probable que cette région soit le foyer d'origine du HIV-1 (Etienne et Peeters, 2010) (figure 2). Pourtant, c'est à près de 1000 Km du sud du Cameroun, en RDC que l'épidémie du VIH-1 groupe M a débuté (Zhu *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2000; Worobey *et al.*, 2008). Cette discordance entre l'origine des virus et celle de l'épidémie humaine peut être expliquée par l'association de plusieurs facteurs impliquant l'hôte, l'agent infectieux et l'environnement. Toutefois, selon Pépin en 2013, par la manipulation de la viande de chimpanzé près de l'angle sud-est du Cameroun, un patient avait acquis le SIVcpz entre 1900 et 1930, ce qui est devenu le VIH-1. Par la suite, une transmission locale a probablement suivi le traitement intraveineux de la maladie du sommeil et d'autres maladies tropicales. Quelques-unes d'entre les personnes atteintes l'auraient transporté à la métropole locale de Léopoldville-Brazzaville, où la transmission sexuelle et/ou parentale aurait permis au virus de persister. Une amplification exponentielle aurait eu lieu en 1950 principalement par la transmission parentale, puis dans les années 1960 par voie hétérosexuelle (liée à l'augmentation de la prostitution par la pauvreté et la décolonisation du Congo, conduisant à une migration vers Léopoldville). A partir des années 1960, le virus a été exporté hors de Léopoldville à d'autres pays africains, mais aussi aux Etats-Unis via des assistants techniques haïtiens qui ont

travaillé au Congo, probablement à travers le tourisme sexuel des hommes gais américains dans les années 1970, puis dans de nombreux autres endroits, principalement en Europe occidentale et en Amérique latine (Pépin, 2013).

I.2.2.2. Origine du VIH-2

Le **HIV-2** est le résultat d'une transmission zoonotique du SIVsmm du mangabey enfumé à l'Homme en Afrique de l'Ouest (figure 2). Ce petit primate vit dans les forêts primaires et secondaires de la côte ouest africaine couvrant le territoire délimité par la rivière Casamance au Sénégal et le système de la rivière Sassandra/Nzo en Côte d'Ivoire (Range et Noë, 2002). Plusieurs arguments alimentent très favorablement cette hypothèse de l'origine du VIH-2. D'abord, l'organisation des génomes du VIH-2 et du SIVsmm est similaire avec notamment la présence du gène *vpx*. L'habitat naturel du mangabey enfumé coïncide avec le foyer endémique du HIV-2 (Hirsch *et al.*, 1989; Lemey *et al.*, 2003). De plus, dans ces régions où ce petit singe est chassé pour sa viande ou utilisé comme animal de compagnie, les contacts directs entre les populations locales et le mangabey enfumé sont courants (Marx *et al.*, 1991). Enfin, il s'y ajoute la forte prévalence de l'infection à SIV chez les mangabeys enfumés dans ces régions.

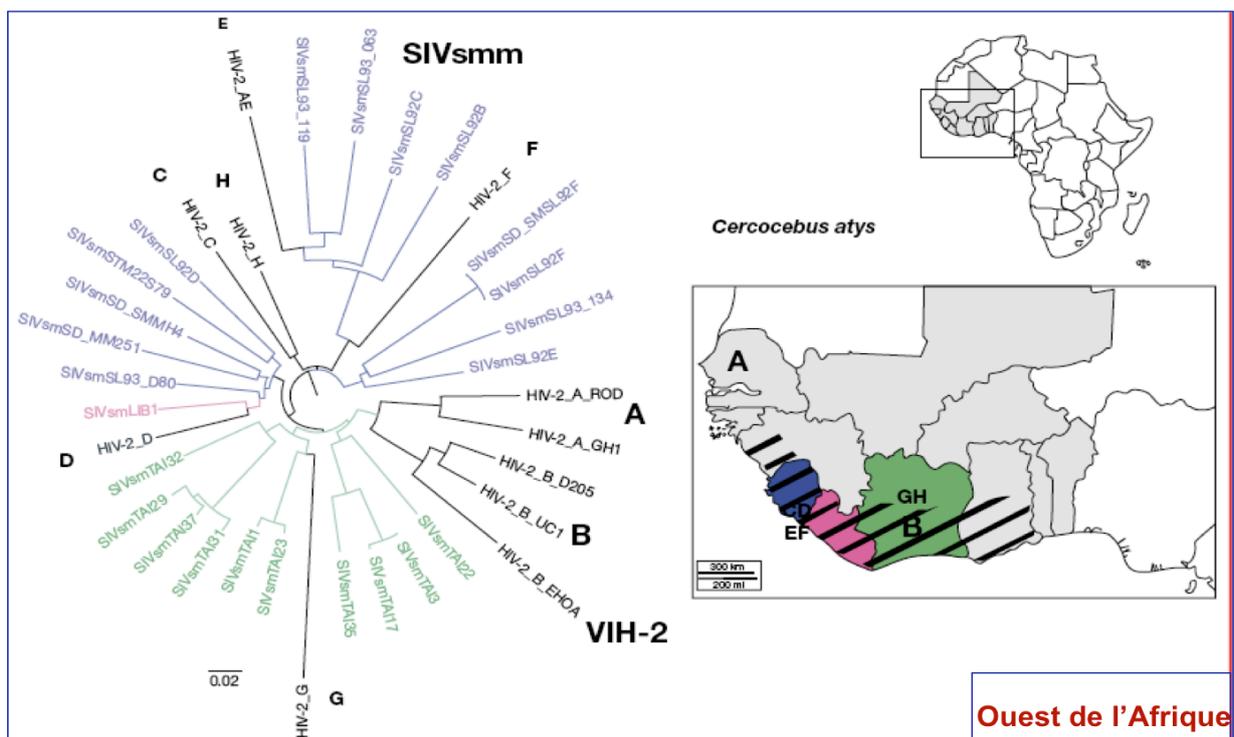


Figure 2. Origine géographique du VIH-2 (pris de Etienne et Peeters, 2010).

Aujourd'hui, ces populations Africaines restent toujours exposées à d'autres transmissions inter-espèces. En effet, on y trouve presque toutes les espèces de grands singes et plusieurs autres espèces

de primates non humains (PNH) qui sont continuellement chassées et consommées par les populations locales. Ils sont donc régulièrement en contact avec divers PNHs dont la plupart avaient été décrites comme naturellement porteuses d'un SIV au Cameroun (Locatelli et Peeters, 2012). Ainsi, le contact avec le sang et les tissus éventuellement infectés à travers la préparation de la viande de brousse, les morsures et griffures des animaux de compagnie, le contact avec les fèces et urines des PNH sont autant d'occasions de transmission d'un rétrovirus du singe à l'Homme. Par conséquent, il convient de poursuivre la veille sanitaire afin de surveiller les rétrovirus dans l'interface Homme-PNH pour prévenir d'éventuelles émergences avant leur établissement dans la population humaine.

I.3. Morphologie, structure et organisation génomique du VIH

I.3.1. Morphologie et structure (figure 3)

Morphologiquement, le VIH apparaît sous forme de particules sphériques (Gelderblom *et al.*, 1987) de 90 à 120 nanomètres de diamètre, hérissées de spicules. Parmi les éléments constitutifs, nous distinguons:

Une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte acquise par le virus lors de sa sortie par bourgeonnement. A la surface de cette enveloppe, on retrouve la glycoprotéine de surface reliée de façon non covalente à la glycoprotéine transmembranaire, l'ensemble faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules.

Une matrice constituée par la protéine p17 est retrouvée sous la bicouche lipidique. Elle est liée à la surface interne de l'enveloppe et stabilise la structure. Elle intervient dans l'étape de l'assemblage et du bourgeonnement du virion (Dorfman *et al.*, 1994; Jouvenet *et al.*, 2011).

Une capsid constituée par la protéine p24 se situe au centre du virus dont il représente la protéine majeure. Elle protège l'ARN et intervient dans la formation des oligomères-p24 conduisant à l'assemblage de la particule virale et dans la morphogénèse de la capsid (Gitti *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2003; Leschonsky *et al.*, 2007).

Une nucléocapsid constituée principalement par une protéine basique p7 liée à l'ARN du virus. Elle joue un rôle dans l'emballage de l'ARN, la rétro-transcription et la stabilité de la particule virale (Feng *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2007; Thomas et Gorelick, 2008).

Un génome viral représenté par deux brins d'ARN de polarité positive, de longueur d'environ 10000 bases.

Des enzymes virales comprenant: la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN) et la protéase (PR).

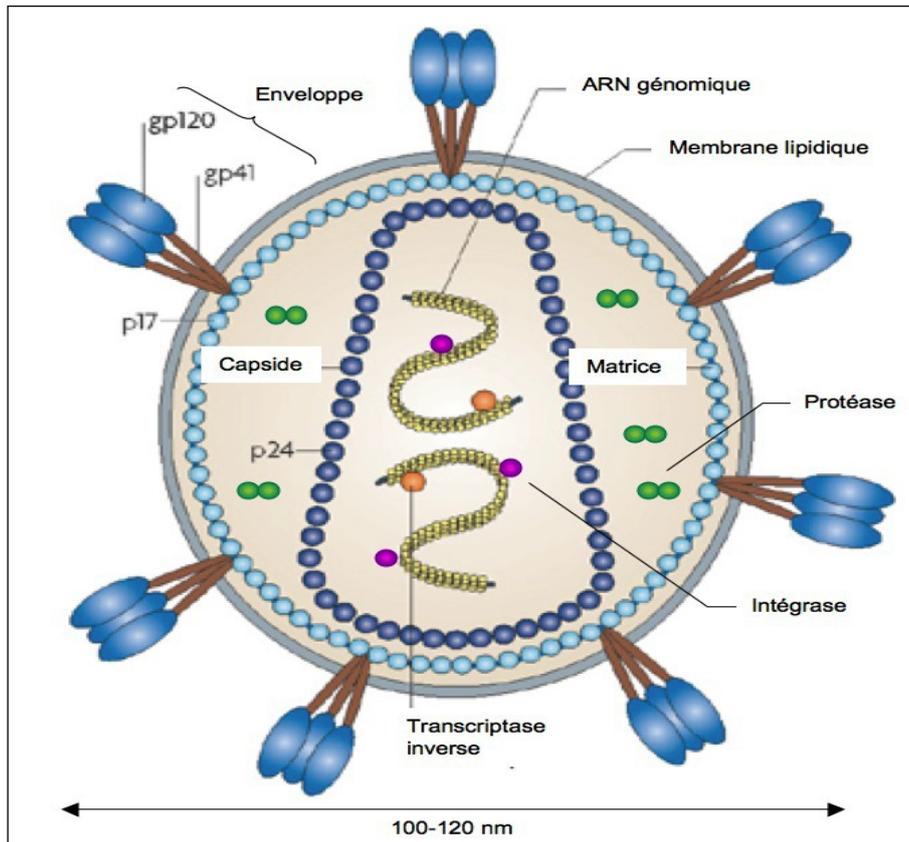


Figure 3. Structure du VIH. (pris de Karlsson Hedestam *et al.*, 2008).

I.3.2. Organisation génomique du VIH

Le génome du VIH est constitué de deux copies d'ARN simple brin d'environ 10 000 nucléotides chacun, de polarité positive. La figure 4 ci-dessous montre l'organisation génomique du VIH et SIV.

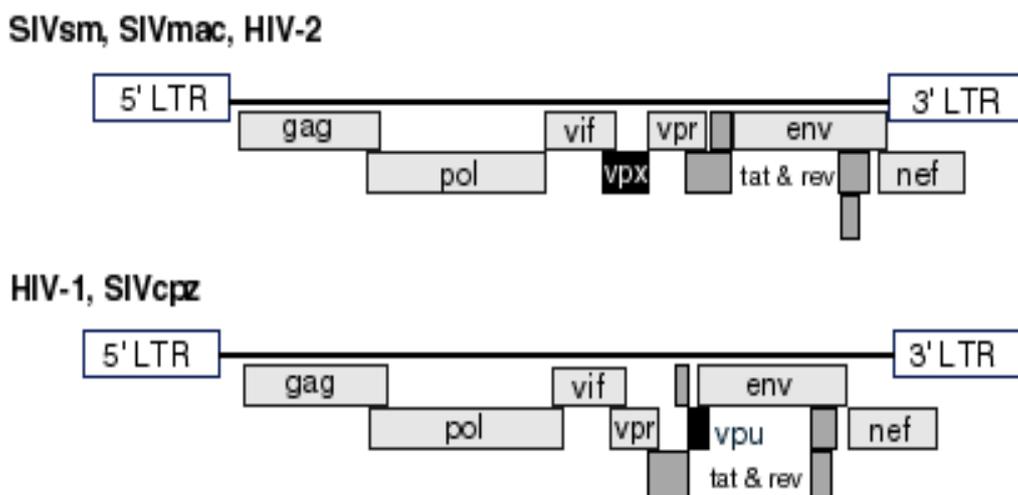


Figure 4. Organisation génomique des VIHs.

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/Beer99/Beer.html>)

Haut: Lignée du VIH-2 qui possède le gène *vpx* bas: Lignée du VIH-1 qui possède le gène *vpu*

Il est flanqué par deux régions répétitives et non codantes, les LTR (Long Terminal Repeats) et possède neuf cadres de lecture ouverts. Trois de ces cadres de lecture codent pour les polyprotéines Gag, Pol et Env, qui sont par la suite clivées en protéines individuelles de structure. Les six autres cadres de lecture codent pour les gènes accessoires encore appelés gènes de régulation: *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* ou *vpx*, *nef*, *vpr* (Lal *et al.*, 2005).

Les lentivirus de primates ont en commun 5 gènes accessoires et la présence variable de deux autres (*vpx* ou *vpu*) selon les virus. Ainsi, on peut distinguer un groupe de virus possédant un *vpu* comprenant le VIH-1, SIVcpz, SIVgor, et SIVgsn, SIVmus, SIVmon; puis un autre groupe possédant un *vpx*, où l'on retrouve le VIH-2 et des VIS isolés du mangabey enfumé (SIVsmm) ainsi que des SIVrcm et SIVmnd-2/drl.

- **les LTR (long terminal repeats)** sont les séquences répétitives qui délimitent le génome viral aux extrémités 5' et 3'. Elles sont composées de trois régions : U5, R, U3. Ces régions sont régulatrices de l'initiation de la rétro-transcription du génome viral, de la polyadénylation et de son intégration au sein du génome de l'hôte (Perkins *et al.*, 1993; Huthoff et Berkhout, 2001).

- **Les gènes de structures du VIH**

- **Le gène des antigènes de groupe (*gag*)** : est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome. Il code une protéine précurseur p55 qui au cours de la maturation sous l'action de la protéase virale est clivé en protéines dont celles de la matrice virale (p17), de la capsid (p24), de la nucléocapsid (P7) dont les rôles sont déjà décrits (Jouvenet *et al.*, 2009; Kutluay et Bieniasz, 2010; Jouvenet *et al.*, 2011).

- **Le gène *pol* (polymérase)**: constitue le gène le plus conservé du génome et code pour les enzymes virales que sont la protéase (PR), la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN), cibles principales du traitement antirétroviral.

La transcriptase inverse est l'une des enzymes du VIH les plus importantes. Elle est responsable de la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN proviral qui va donner naissance à un ADN double brin capable de s'intégrer dans le génome cellulaire. Elle est dépourvue de fonction de correction des nombreuses erreurs qui surviennent lors de la réplication élevée et est donc en partie responsable de la grande diversité du VIH (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Mulky *et al.*, 2005; Bochner *et al.*, 2008).

La protéase virale joue un rôle important dans la maturation de la particule virale en permettant le clivage des polyprotéines Gag et Gag-Pol (Pettit *et al.*, 1991).

L'intégrase catalyse l'insertion dans le génome de la cellule infectée de l'ADN proviral obtenu après rétrotranscription par les séquences LTR qui constituent les points d'ancrage

(Johnson *et al.*, 2006; Jaskolski *et al.*, 2009).

- **Le gène *env* (enveloppe)**: est la partie la plus variable du génome du virus et est caractérisé par un polymorphisme important qui permet au virus d'échapper au système immunitaire. Le gène *env* code pour la Gp160 qui génère les deux glycoprotéines (Gp120 et Gp41) apparaissant à la surface des virions et des cellules infectées, et impliquées dans l'entrée du virus, la fusion des cellules et la cytolysse de la cellule infectée (hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2013compendium.html).

La glycoprotéine de surface (gp120) est composée de 5 domaines constants (C1-C5) bien conservés d'une souche à l'autre et de 5 domaines hypervariables (V1-V5) qui forment à leur base des boucles. Parmi elles, la boucle V3 apparaît importante dans le choix du tropisme viral (Gaibelet *et al.*, 2006).

La glycoprotéine transmembranaire (gp41) contient un domaine N-terminal, promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminales de la Gp120 (Chan *et al.*, 1997; Buzon *et al.*, 2010).

- *Les gènes de régulations*

Ils codent pour des protéines virales régulatrices et interagissent avec des facteurs cellulaires.

Le gène *tat* (Transactivator of Transcription): joue un rôle dans l'adaptation moléculaire et l'orientation de la machinerie cellulaire dans le sens de la transcription virale. Il est également modulateur d'expression de gènes cellulaires ou d'autres virus et participe ainsi à la pathogénicité de l'infection par le VIH (Giunta *et al.*, 2008; Romani *et al.*, 2010). Il peut induire l'apoptose des cellules voisines qui ne sont pas infectées (De Mareuil *et al.*, 2005).

Le gène *rev* (Regulator of Expression Virion protein): la phosphoprotéine pp20Rev codée par ce gène se retrouve dans le noyau de la cellule infectée et agit dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure (Brandt *et al.*, 2007; Pond *et al.*, 2009). Elle intervient dans l'exportation nucléaire, la stabilisation de la traduction de l'ARN du VIH (Arrigo et Chen, 1991; Groom *et al.*, 2009). Elle augmente la durée de vie des ARN viraux dans le noyau et inhibe les molécules inhibitrices de transport (Malim et Cullen, 1993). Elle contrôlerait l'activité de l'intégrase (Rosenbluh *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2009).

- *Les gènes accessoires*

Le gène *vif* (Virion infectivity factor): code pour une protéine cytoplasmique de 23 kDa libre dans le cytosol (Li *et al.*, 2005). *Vif* intervient dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique (Ohagen et Gabuzda, 2000; Guo *et al.*, 2007) et la modulation de la TI virale (Cancio *et al.*, 2004). Elle empêche les effets antiviraux de la protéine cellulaire APOBEC (Apolipoprotein B mRNA

editing enzyme) en induisant sa dégradation par le protéosome (Yu *et al.*, 2003; Goila-Gaur *et al.*, 2008).

Le gène *vpr* (*viral protein R*): code pour une protéine accessoire multifonctionnelle, de 14 kDa et contribue à la pathogenèse du VIH-1 par une transactivation des LTR (Zhao *et al.*, 2005). Elle est incorporée dans les virions et agit dans le transport du complexe de pré intégration dans le noyau, l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G2 et l'induction de l'apoptose (Le Rouzic et Benichou, 2005; Andersen *et al.*, 2008). Par ailleurs, au niveau des macrophages, Vpr joue aussi un rôle important dans l'accumulation d'un réservoir persistant pour l'infection VIH dans les cellules de la lignée myéloïde (Kogan et Rappaport, 2011).

Le gène *vpu* (*viral protein U*): est spécifique aux lignées de VIH-1, SIVcpz, SIVgor, SIVgsn et absent chez le VIH-2 et SIVsmm. Il code pour une protéine de 81 acides aminés ayant plusieurs fonctions biologiques. En effet, Vpu interagit avec la queue cytoplasmique du CD4 et entraîne sa poly-ubiquitination par un complexe ligase et sa dégradation dans le protéosome, réduisant ainsi l'expression de CD4 à la surface cellulaire (Margottin *et al.*, 1998; Binette *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2009). Elle peut également détacher la Tetherin de la surface des cellules en la redirigeant et en la séquestrant dans un compartiment périnucléaire, ce qui bloque ainsi son activité (Hauser *et al.*, 2010). Cette inhibition permet la libération des virions de la membrane plasmique des cellules infectées (Neil *et al.*, 2008) mais aussi le transfert de virus de cellule à cellule (Casartelli *et al.*, 2010).

Le gène *vpx* (*viral protein X*) code pour la protéine vpx de 12 kDa spécifique au VIH-2, SIVsmm, SIVrcm, SIVmnd-2/drl. Son rôle n'est pas totalement élucidé, mais il est d'une importance majeure dans l'infection des macrophages (Malim et Emerman, 2008). Vpx est capable d'induire la dégradation dans le protéosome d'un facteur de restriction, SAMHD1 (Hrecka *et al.*, 2011; Laguette *et al.*, 2011) qui, en l'absence de Vpx, empêche l'infection par le VIH des cellules dendritiques et des cellules de la lignée myéloïde.

Le gène *nef* (*negative factor*) code pour la protéine multifonctionnelle myristoylée de 27 kDa Nef, associée à la partie cytoplasmique des membranes cellulaires. Elle affecte l'expression en surface de plusieurs protéines cellulaires et accélère l'endocytose de CD4, CD8 et CD28 de la surface des cellules infectées (Stove *et al.*, 2005; Chaudhuri *et al.*, 2007). Elle diminue aussi les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (Roeth et Collins, 2006; Schindler *et al.*, 2006) et régule le récepteur des cellules T (Thoulouze *et al.*, 2006). En plus de moduler l'infectivité du VIH grâce à des interactions avec les protéines de l'enveloppe cellulaire, Nef facilite la

pénétration du virus dans le réseau d'actine cortical lors des phases initiales de l'infection (Pizzato *et al.*, 2007).

I.4. Le cycle de réplication du VIH

Le VIH infecte de façon productive les cellules présentant un récepteur CD4 à leur surface. Ce récepteur est une glycoprotéine monomérique exprimée à la surface des lymphocytes T CD4 et à des taux plus faibles par les monocytes/macrophages (Morrow *et al.*, 2007). Il existe cependant d'autres cibles du VIH comme les cellules de Langerhans et les cellules microgliales cérébrales. Outre la molécule CD4, l'infection par le VIH nécessite la présence de corécepteurs ou chimiokines dont les principaux sont le CXCR4 et le CCR5. Les corécepteurs CCR5 sont exprimés par les cellules dendritiques et les macrophages des virus qui sont dits à tropisme R5, tandis que les corécepteurs CXCR4 sont exprimés par de nombreux types cellulaires dont les lymphocytes T CD4 dits à tropisme X4 (Kim *et al.*, 2009).

La réplication virale a donc lieu dans de nombreux tissus et liquides biologiques et le cycle de réplication peut être subdivisé en 4 étapes principales comme le montre la figure 5 ci-dessous.

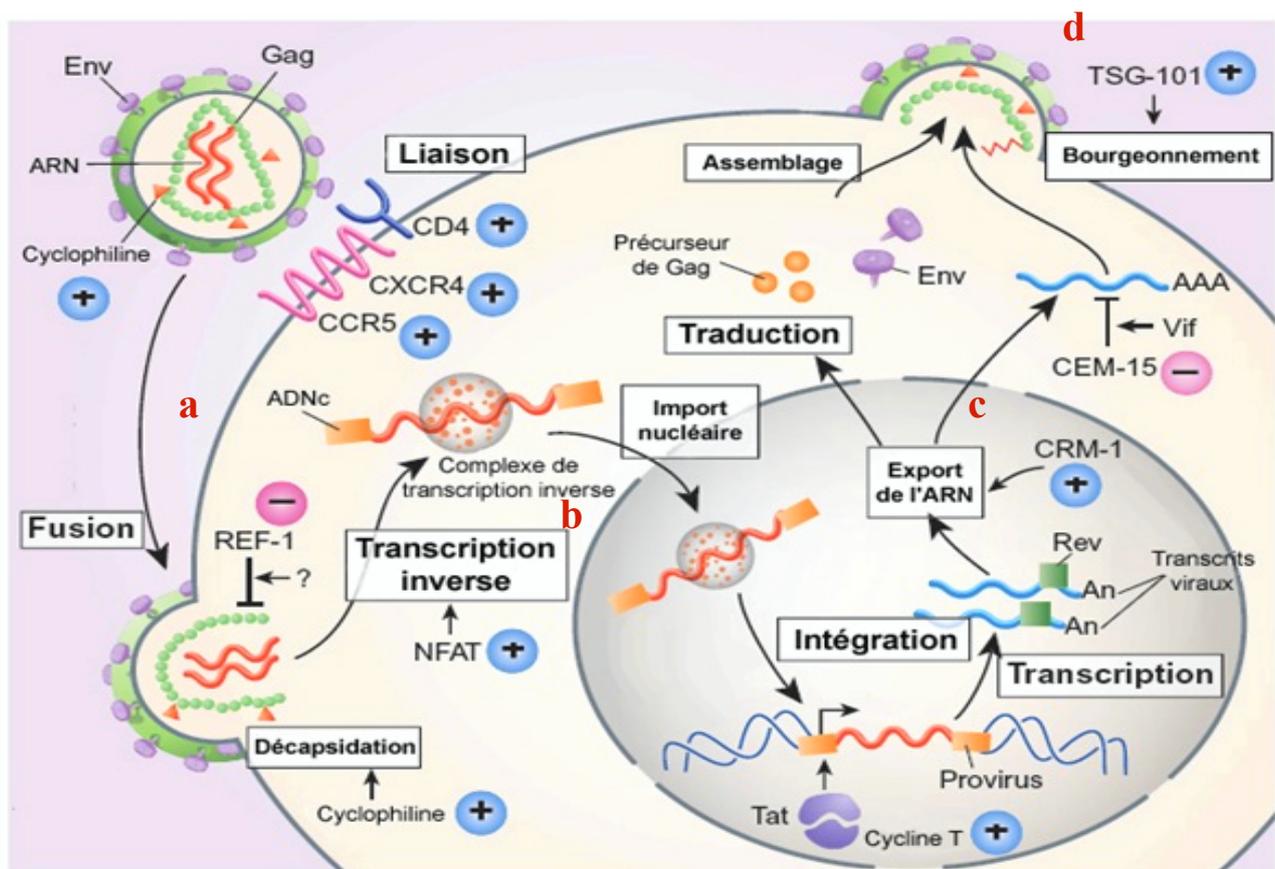


Figure 5. Cycle de réplication du VIH

(<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/23548/ch01.html>) (Consulté le 17/07/2013).

Schéma des étapes clés du cycle de réplication virale du VIH, a: étapes de fixation et d'entrée du virus, b: étapes de transcription inverse et d'intégration, c: étapes d'expression des gènes et d'assemblage et d: étapes de bourgeonnement et de maturation du virion.

Ces étapes comprennent la fixation et l'entrée du virus dans sa cellule cible (a), la transcription inverse de l'ARN simple brin en ADN double brins et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte (b), l'expression des gènes et l'assemblage du virus (c), et le bourgeonnement du virion et sa maturation (d).

I.4.1. L'étape de fixation et d'entrée du virus dans la cellule hôte

Le processus d'entrée dans la cellule cible requiert des interactions spécifiques entre l'enveloppe virale et des récepteurs de surface cellulaire. Les trimères de la glycoprotéine de surface gp120 interagissent avec le récepteur CD4, entraînant la fixation du virus à la cellule cible. Ceci induit un changement de conformation de ces deux molécules permettant le recrutement du corécepteur cellulaire (CXCR4 ou le CCR5). L'interaction entre gp120, CD4 et le corécepteur induit un changement conformationnel radical de la sous-unité transmembranaire gp41 qui conduit à l'interaction de ses régions N et C terminales. Cela entraîne la formation d'une structure en hélice permettant le rapprochement puis la fusion des membranes virale et cellulaire. La capsid est alors libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte où elle se désagrège et libère son contenu (figure 5).

I.4.2. La transcription inverse et l'intégration au génome cellulaire

Caractéristique principale des rétrovirus, la transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin commence immédiatement après l'entrée du core du virion dans le cytoplasme de la cellule infectée et sa décapsidation. Cette dernière pourrait intervenir suite à l'action de différentes protéines cellulaires et virales comme la cyclophiline A, Vif et Nef. La transcription inverse est réalisée par la transcriptase inverse (TI ou RT) qui possède trois activités enzymatiques distinctes: i) polymérisation d'ADN à partir de l'ARN génomique viral, ii) activité RNaseH et iii) polymérisation d'ADN à partir de l'ADN viral nouvellement synthétisé. A noter également l'importance de Vif pour l'étape de transcription inverse. Elle va limiter l'effet mutagène induit par la désaminase APOBEC3G en favorisant sa séquestration cytoplasmique lors de l'assemblage viral (Henriet *et al.*, 2005). Ainsi, l'ADN double brin s'associe avec des protéines cellulaires et virales en un complexe nucléoprotéique de pré-intégration qui est alors transporté jusqu'au noyau. Par la suite, l'ADN viral est intégré dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée par l'action de l'intégrase virale et le virus deviendra provirus.

I.4.3. L'expression des gènes et l'assemblage du virus

Le LTR 5' contient des éléments promoteurs qui vont permettre l'expression du génome viral. À partir du promoteur viral situé en 5' du LTR, les copies intégrées d'ADN du VIH-1 servent de matrice pour la synthèse d'ARN messagers viraux grâce à l'ARN polymérase II (l'ARN Pol II) et

aux actions coordonnées de la protéine Tat et d'autres facteurs de transcription. En effet, la phosphorylation de la queue C-terminale de l'ARN polymérase II va activer l'élongation de la transcription et stimuler le << capping>> (ajout en 5' d'un nucléotide modifié pour permettre aux mécanismes de transport et de traduction de reconnaître l'ARN messenger des autres formes d'ARN) des ARNs viraux naissants (Zhou *et al.*, 2003).

La réplication rétrovirale exige une exportation nucléaire de l'ARN messenger provenant d'un épissage alternatif de l'ARN viral génomique. L'ARNm non épissé de 9 kb code pour Gag ou Gag-Pol, quatre ARNm d'environ 4 kb sont épissés séparément. Ils codent pour Vif, Vpr, Vpu, et Env. Enfin, trois ARNm sont produits par multi-épissage. Ils aboutissent à des ARNm de 2 kb environ et codent pour Tat, Rev et Nef. Rev est la protéine virale qui contrôle les différents épissages de l'ARNm. Alors que Rev et Tat interagissent avec l'ARN viral, Nef agit sur l'environnement cellulaire afin de favoriser l'assemblage. Les précurseurs Gag-Pol s'assemblent à la membrane plasmique dans des régions riches en lipides (radeaux lipidiques) et en protéines d'enveloppe en un virion immature qui sortira de la cellule par bourgeonnement.

I.4.4. Le bourgeonnement du virion et sa maturation

Des virions immatures sont alors formés et lors du bourgeonnement, le virion entraîne la bicouche lipidique de la membrane cellulaire dans laquelle sont encastrés les trimères de gp120. Ces éléments fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les virus dans le milieu extracellulaire. Une fois à l'extérieur de la cellule, la protéase virale clive les précurseurs Gag-Pol rendant ainsi les particules virales matures et pleinement infectieuses. La transmission de cette dernière se fait principalement par contact sanguin ou par échange de fluides corporels comme le sperme et les sécrétions vaginales. Les modes de transmission les plus souvent rapportés sont les relations sexuelles non protégées, l'échange de seringues contaminées et la transmission verticale entre la mère et l'enfant et sont à l'origine du nombre important de personnes infectées dans le monde.

Chapitre II: Épidémiologie du VIH

II.1. Épidémiologie globale du VIH dans le monde

Le VIH, responsable du SIDA est l'un des défis de santé et de développement le plus important dans le monde. D'après le rapport de l'ONUSIDA de 2012, aujourd'hui, plus de 30 ans après la description des premiers cas, il existe à travers le monde, environ 34 millions de personnes qui vivent actuellement avec le VIH en 2011 et plus de 25 millions sont déjà décédés du SIDA. Le tableau I ci-dessous contient les estimations globales et régionales sur l'infection à VIH en 2011.

Tableau I. Données globales et régionales sur l'infection à VIH en 2011

http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf (consulté le 16/05/2013)

		Adultes et enfants vivant avec le VIH	Adultes et enfants nouvellement infectés par le VIH
AFRIQUE SUBSAHARIENNE	2011	23,5 millions [22 100 000–24 800 000]	1,8 million [1 600 000–2 000 000]
	2001	20,9 millions [19 300 000–22 500 000]	2,4 millions [2 200 000–2 500 000]
MOYEN-ORIENT ET AFRIQUE DU NORD	2011	300 000 [250 000–360 000]	37 000 [29 000–46 000]
	2001	210 000 [170 000–270 000]	27 000 [22 000–34 000]
ASIE DU SUD ET DU SUD-EST	2011	4,0 millions [3 100 000–4 600 000]	280 000 [170 000–370 000]
	2001	3,7 millions [3 200 000–5 100 000]	370 000 [250 000–450 000]
ASIE DE L'EST	2011	830 000 [590 000–1 200 000]	89 000 [44 000–170 000]
	2001	390 000 [280 000–530 000]	75 000 [55 000–100 000]
OCÉANIE	2011	53 000 [47 000–60 000]	2 900 [2 200–3 800]
	2001	38 000 [32 000–46 000]	3 700 [3 100–4 300]
AMÉRIQUE LATINE	2011	1,4 million [1 100 000–1 700 000]	83 000 [51 000–140 000]
	2001	1,2 million [970 000–1 500 000]	93 000 [67 000–120 000]
CARAÏBES	2011	230 000 [200 000–250 000]	13 000 [9 600–16 000]
	2001	240 000 [200 000–270 000]	22 000 [20 000–25 000]
EUROPE DE L'EST ET ASIE CENTRALE	2011	1,4 million [1 100 000–1 800 000]	140 000 [91 000–210 000]
	2001	970 000 [760 000–1 200 000]	130 000 [99 000–170 000]
EUROPE OCCIDENTALE ET CENTRALE	2011	900 000 [830 000–1 000 000]	30 000 [21 000–40 000]
	2001	640 000 [590 000–710 000]	29 000 [26 000–34 000]
AMÉRIQUE DU NORD	2011	1,4 million [1 100 000–2 000 000]	51 000 [19 000–120 000]
	2001	1,1 million [850 000–1 300 000]	50 000 [35 000–71 000]
MONDE	2011	34,0 millions [31 400 000–35 900 000]	2,5 millions [2 200 000–2 800 000]
	2001	29,4 millions [27 200 000–32 100 000]	3,2 millions [2 900 000–3 400 000]

monde, le continent Africain reste le plus touché avec 69% (23,5million) des personnes vivant avec le VIH résidant en Afrique sub-saharienne. Même si le taux annuel de nouvelles infections a diminué de 20% depuis 2001, on dénombre environ 2,5 millions de nouvelles infections en 2011. Les baisses les plus importantes du nombre de nouvelles infections entre 2001 et 2011 ont été enregistrées dans les Caraïbes (42 %) et en Afrique subsaharienne (25%) (Tableau I).

Par ailleurs, l'épidémie est relativement stable et contrôlée dans les populations générales des pays industrialisés. Toutefois, les tendances demeurent préoccupantes dans certaines régions du monde. En effet, le nombre de nouvelles infections au Moyen-Orient et en Afrique du Nord a augmenté de plus de 35% depuis 2001 (tableau I). Aussi, après être restée relativement stable pendant plusieurs années, l'incidence de l'infection à VIH en Europe de l'Est et en Asie centrale a commencé à augmenter à la fin des années 2000. Dans au moins 9 pays, les tendances épidémiologiques étaient moins favorables avec en 2011, un nombre de nouvelles infections de 25% de plus qu'en 2001 (ONUSIDA, 2012). Cependant, dans la plupart de ces pays, l'épidémie se concentre dans un nombre restreint de provinces et de groupes de population. Les consommateurs de drogues injectables, les HSHs ainsi que les professionnelles du sexe et leurs clients représentaient l'essentiel des nouvelles infections (ONUSIDA, 2012). Par conséquent, la transmission aux partenaires féminines de ces derniers devient courante. L'instabilité socio-économique dans certaines régions contribue également à la propagation de l'épidémie.

En raison de l'élargissement et de l'intensification des traitements antirétroviraux ainsi que de la diminution de l'incidence, le nombre de décès liés au SIDA a commencé à baisser au milieu des années 2000. En 2011, on estime à 1,7 million le nombre de décès liés au SIDA, soit une baisse de 24% par rapport aux 2,3 millions de 2005. Les baisses du nombre de décès liés au SIDA les plus considérables entre 2005 et 2011 ont été enregistrées aux Caraïbes (48%) et en Océanie (41%) (ONUSIDA, 2012). D'autres diminutions moins importantes ont été observées au cours de la même période en Amérique latine (10%), en Asie (4%), en Europe de l'Ouest et du centre ainsi qu'en Amérique du Nord (1%). Cependant, les régions comme l'Europe de l'Est et l'Asie centrale (21%) d'une part et le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord (17%) d'autre part, ont enregistré des augmentations importantes de la mortalité liée au SIDA (ONUSIDA, 2012).

II.2. Epidémiologie du VIH en Afrique

L'Afrique reste le continent le plus durement touchée par le VIH avec près de 69% (n=23,5 millions) de toutes les personnes vivant avec le VIH en 2011 (ONUSIDA, 2012). De nombreuses épidémies nationales ont considérablement évolué ces dix dernières années. Parmi les 39 pays

ayant enregistré de fortes baisses en matière d'incidence de l'infection à VIH chez les adultes (chute de plus de 25%) de 2001 à 2011, 23 se situent en Afrique subsaharienne. Le nombre de personnes infectées par le VIH en 2011 (1,8 million) était de 25% inférieur aux 2,4 millions de 2001 (ONUSIDA, 2012). Toutefois, malgré ces progrès, l'Afrique subsaharienne représentait 71% des nouvelles infections chez les adultes et les enfants en 2011, montrant ainsi l'importance de poursuivre et de renforcer les efforts de prévention du VIH dans la région. Le tableau II ci-dessous montre les estimations des prévalences de VIH chez les adultes entre 15-49 ans en Afrique subsaharienne.

Tableau II. Estimation de la prévalence de VIH chez les adultes de 15-49 ans en Afrique Sub-saharienne en 2011 (pris de ONUSIDA, 2012)

	2001			2011		
	Estimation	Estimation basse	Estimation haute	Estimation	Estimation basse	Estimation haute
Libéria	2,50	1,70	3,30	1,00	0,80	1,40
Madagascar	0,30	0,20	0,60	0,30	0,20	0,40
Malawi	13,80	12,80	14,70	10,00	9,50	10,60
Mali	1,60	1,30	2,00	1,10	0,80	1,50
Mauritanie	0,60	0,40	1,20	1,10	0,60	2,00
Maurice	0,90	0,60	1,30	1,00	0,70	1,40
Mozambique	9,70	8,70	11,00	11,30	10,00	12,70
Namibie	15,50	12,40	18,90	13,40	10,80	16,40
Niger	0,80	0,80	1,00	0,80	0,70	0,90
Nigéria	3,70	3,00	4,10	3,70	3,30	4,00
Rwanda	4,10	3,60	4,70	2,90	2,60	3,50
Sao Tomé-et-Principe	0,90	0,70	1,20	1,00	0,60	1,40
Sénégal	0,50	0,40	0,60	0,70	0,60	0,90
Sierra Leone	0,90	0,60	1,30	1,60	1,20	2,20
Afrique du Sud	15,90	15,10	16,80	17,30	16,60	18,10
Soudan du Sud	3,10	2,10	4,20
Swaziland	22,20	20,80	23,50	26,00	24,80	27,20
Tanzanie	7,20	6,80	7,70	5,80	5,40	6,20
Togo	4,10	3,10	5,10	3,40	2,70	4,30
Ouganda	6,90	6,20	7,20	7,20	6,90	7,70
Zambie	14,40	13,50	15,40	12,50	11,70	13,80
Zimbabwe	25,00	23,80	26,00	14,90	14,30	15,70
Angola	1,70	1,20	2,60	2,10	1,50	3,20
Bénin	1,70	1,40	2,00	1,20	1,10	1,40
Botswana	27,00	25,70	28,40	23,40	22,30	24,60
Burkina Faso	2,10	1,80	2,60	1,10	1,00	1,50
Burundi	3,50	3,10	4,10	1,30	1,20	1,60
Cameroun	5,10	4,70	5,60	4,60	4,30	5,00
Cap-Vert	1,00	0,70	1,40	1,00	0,70	1,40
République centrafricaine	8,10	7,10	8,90	4,60	3,20	5,00
Tchad	3,70	3,00	4,60	3,10	2,70	4,20
Comores	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,10	< 0,1	0,10
Congo	3,80	3,30	4,40	3,30	2,90	3,70
Côte d'Ivoire	6,20	5,60	6,70	3,00	2,70	3,40
Guinée équatoriale	2,50	1,90	3,00	4,70	4,30	6,80
Érythrée	1,10	0,70	2,00	0,60	0,30	1,50
Éthiopie	3,60	3,30	3,90	1,40	1,30	1,60
Gabon	5,20	3,60	7,40	5,00	3,60	7,50
Gambie	0,80	0,40	1,80	1,50	0,70	2,90
Ghana	2,20	1,90	2,50	1,50	1,30	1,70
Guinée	1,50	1,10	2,10	1,40	1,10	1,80
Guinée-Bissau	1,40	1,00	1,80	2,50	2,10	3,00
Kenya	8,50	8,20	8,80	6,20	5,90	6,30
Lesotho	23,40	22,40	24,50	23,30	22,50	24,30

Les prévalences parmi les adultes de 15-49 ans les plus faibles (< ou = 0,1%) sont retrouvées dans les pays du Nord comme la Tunisie, l’Egypte, le Maroc et l’Algérie. Dans l’Est et le Centre de l’Afrique, elles diffèrent selon les pays. Elles peuvent être < ou = 1% (Somalie, Soudan). Dans 9 pays surtout du Sud, plus de 10% des adultes sont estimés être positifs au VIH. L’Afrique du Sud (17,3% de prévalence en 2011) compte le plus grand nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde (5,6 millions). Par contre le Swaziland a le taux de prévalence le plus élevé dans le monde (26% en 2011). En Afrique de l’Ouest, les prévalences sont estimées en 2011 aux alentours de 1% (Sénégal, Mali, Mauritanie et Niger). Elle est estimée entre 1 et 2% pour la Gambie, la Guinée, et > 2,5% pour la Guinée-Bissau et la Côte d’Ivoire (ONUSIDA, 2012). La quasi-totalité des pays de la région Africaine a une épidémie de VIH de type généralisé, avec des prévalences supérieures à 1%.

Aussi, le VIH reste un grave problème de santé pour les jeunes âgés de 15-24 ans, avec plus de 2400 nouvelles infections en 2011. Il affecte davantage les femmes et les filles surtout en Afrique sub-saharienne, qui représentent 60% des personnes vivant avec le VIH. Globalement, on estime à 1,2 million, les femmes et les filles nouvellement infectées par le VIH en 2011. Cette vulnérabilité particulière des femmes est essentiellement d’ordre socioculturel, physiologique, épidémiologique et aussi économique.

En effet, en dehors du fait que la muqueuse vaginale est fragile et que le sperme peut rester plusieurs jours dans le tractus génital féminin, la quantité du VIH est plus importante dans le sperme que dans les sécrétions vaginales. Par ailleurs, les autres infections sexuellement transmissibles (IST), l’immaturité du col chez les jeunes femmes, la période suivant l’accouchement, la ménopause qui fragilise les muqueuses, les rapports traumatisants ou non désirés dans lesquels la lubrification est insuffisante (pouvant favoriser des micros lésions), sont autant d’autres facteurs biologiques accentuant la vulnérabilité des femmes. Physiquement, les femmes peuvent être économiquement, socialement, émotionnellement ou culturellement dans l’impossibilité d’exiger la protection de leurs rapports sexuels. Par amour, par peur de la séparation, de l’insécurité financière ou de la solitude, certaines femmes pour garder leur partenaire sont prêtes à accepter des relations à risques non protégées. Il a été décrit que, dans les épidémies généralisées, ces facteurs sont significativement associés à un risque accru d’infection par le VIH chez les femmes (Jewkes *et al.*, 2010). Par conséquent, l’amélioration du statut social et économique des femmes, par la réduction de leur dépendance à l’égard des partenaires masculins et le renforcement de leur pouvoir de décision, peut contribuer à réduire leur risque de contracter le VIH.

II.3. Épidémiologie dans les groupes vulnérables

La transmission par voie sexuelle s’effectue essentiellement par les muqueuses vaginales,

vulvaires, péniennes ou rectales qui sont des portes d'entrée efficaces en particulier pour le partenaire receveur. Toutefois, la probabilité de contamination dépend de plusieurs facteurs incluant le type de rapport sexuel (vaginal/anal), les fréquences et durées des expositions, la charge virale du VIH dans les sécrétions, le stade de l'infection ainsi que beaucoup d'autres facteurs (Galvin et Cohen, 2004). Par ailleurs, les groupes à risques étant plus exposés à l'infection que le reste de la population, ils jouent un rôle déterminant dans la diffusion de l'épidémie de SIDA par le biais d'évènements fondateurs. Dans tous les pays touchés par une épidémie généralisée, la prévalence du VIH est systématiquement plus élevée dans les groupes à haut risque d'infection qu'au sein de la population générale.

Des données récentes ont montré que la prévalence mondiale du VIH chez **les professionnelles du sexe** est estimé à 12% (Baral *et al.*, 2012). Cependant, les prévalences sont variables selon les pays atteignant 70% en Swaziland où la prévalence nationale est estimée aux alentours de 26% dans la population générale (ONUSIDA, 2012).

Comme chez les PS, les prévalences de l'infection à VIH sont au moins 22 fois plus élevées chez les **consommateurs de drogues injectables** qu'au sein de la population générale (ONUSIDA 2012). En effet, en Europe de l'Est et en Asie centrale où le nombre de nouvelles infections a augmenté, les épidémies nationales sont généralement déclenchées par la transmission liée à la consommation de drogues, puis par la transmission aux partenaires sexuels de ces derniers.

Quant aux **HSHs**, à cause de rapports sexuels non protégés, d'antécédents d'IST et d'une mauvaise connaissance de ces infections, ils restent les plus durement touchés par l'infection à VIH. Selon les enquêtes réalisées dans les capitales, les prévalences du VIH chez ces hommes sont systématiquement en moyenne 13 fois plus élevées que celles au sein des populations générales (ONUSIDA 2012). La figure 23 montre les prévalences de l'infection à VIH chez les HSHs par rapport à la population générale dans certains pays.

Dans certains pays comme Sénégal, Panama, Swaziland les prévalences sont estimées à plus de 20%. Pour d'autres pays de l'Afrique Centrale comme la République Démocratique du Congo, le Cameroun et la République centre Africaine, elles sont de plus de 30% (figure 6) (ONUSIDA 2012).

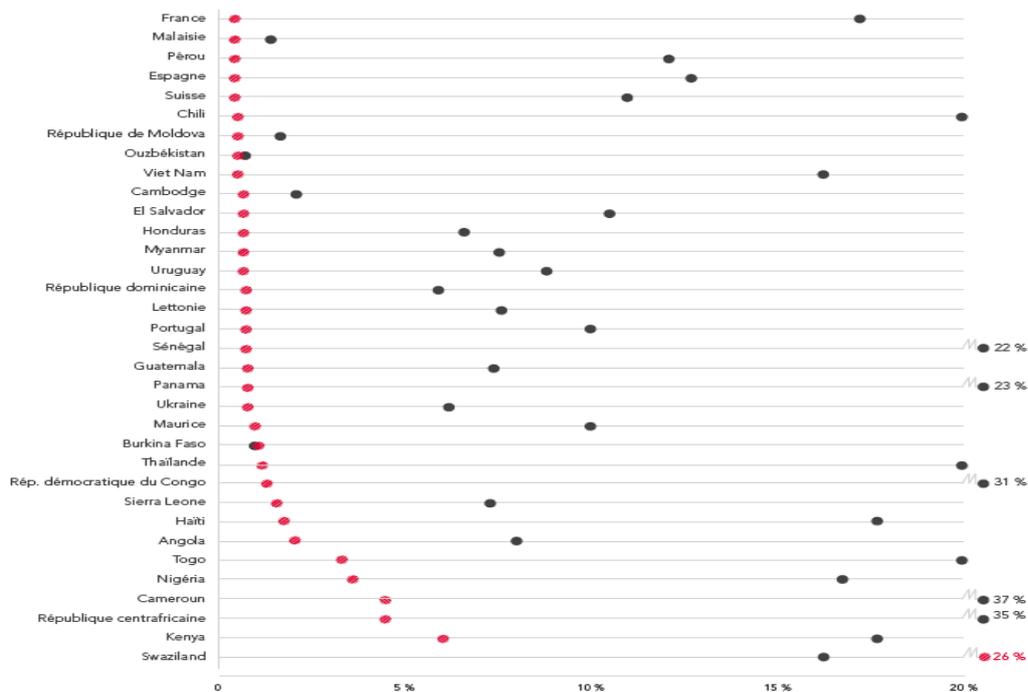


Figure 6. Prévalences de VIH chez les HSHs par rapport à la population générale dans certains pays (UNAIDS, 2012)

Bien que le VIH/SIDA demeure une priorité majeure de santé mondiale, les efforts internationaux mis en place au cours de cette dernière décennie pour lutter contre cette pandémie ont généré d'importants progrès. Même si dans de nombreuses régions du monde les épidémies nationales continuent de progresser, à l'échelle mondiale, l'incidence de VIH continue de diminuer. Plusieurs facteurs sont associés à cela. Les plus remarquables sont entre autres, le meilleur accès aux soins qui a permis de prolonger la vie des personnes infectées. Elle est aussi attribuée aux modifications des comportements à risque (réduction du nombre de partenaires, l'utilisation accrue du préservatif...), à l'accroissement des interventions biomédicales, comme la circoncision masculine, les prophylaxies pré-exposition etc (ONUSIDA, 2012). Cependant, il reste d'importants défis à relever car bien que la baisse du nombre de décès liés au SIDA et de nouvelles infections à VIH soit importante, les circonstances de l'épidémie qui pèse sur les pays et les régions continuent de varier considérablement.

La population virale homogène retrouvée chez une personne infectée évolue au cours du temps, du fait de l'absence de correction de la TI et de la dynamique très élevée de la réplication du VIH. Cette évolution du VIH, qui est extrêmement rapide, est à l'origine du grand nombre de variants viraux répartis de façon inégale à travers le monde.

Chapitre III: La Diversité génétique du VIH

III.1. Causes de la variabilité génétique

La grande variabilité génétique du VIH résulte de plusieurs facteurs dépendant du virus mais aussi de l'hôte. Parmi les causes essentielles de cette grande diversité, nous avons le taux d'erreur de la transcriptase reverse, la dynamique élevée de la réplication virale, les phénomènes de recombinaison ainsi que les pressions de sélection.

- Absence de fonction de correction de la transcriptase inverse (TI):

La transcriptase inverse est l'enzyme responsable de la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN au cours de la réplication du VIH. Cependant, l'absence d'activité de correction exonucléasique 3'-5' de la TI conduit à la production d'un taux élevé d'erreurs au cours de la synthèse du brin d'ADN (au moins une erreur par génome et par cycle répliatif). Ces erreurs sont à l'origine d'un nombre élevé de mutations. Ces mutations peuvent être neutres, sans effet sur les capacités du virus à se répliquer; elles peuvent aussi être létales, entraînant un arrêt de la réplication virale. Enfin, elles peuvent conférer au virus des avantages répliatifs.

- La recombinaison virale: La recombinaison génétique est un élément fondamental de l'évolution. Elle est définie comme un processus au cours duquel du matériel génétique est échangé entre deux virus, donnant naissance à un descendant qui possède du matériel génétique provenant des deux parents. Les deux virus parentaux doivent être capables d'infecter le même patient et le même répertoire cellulaire, à l'occasion soit d'une co-infection (infection simultanée), soit d'une surinfection (infections successives).

Au niveau moléculaire, la recombinaison s'effectue lors de la réplication d'un virus, la réplacase peut copier des fragments d'ARN des deux virus. Ce processus génétique peut se réaliser entre des virus proches (recombinaison homologue), ou plus éloignés (recombinaison hétérologue). La transcriptase inverse des rétrovirus a une forte capacité recombinogène et du fait de la présence de deux brins d'ARN chez les lentivirus de primate, un arrêt de la transcription peut pousser la transcriptase inverse à sauter d'un brin à l'autre (Jetzt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Cet arrêt peut être causé par plusieurs raisons: une présence de cassures (délétions ou discontinuités) sur le génome (Coffin, 1979), une forte présence de sites de pause (stop) riche en G et C (Destefano *et al.*, 1992; 1994) ou par Mega primer ou invasion liée à une dégradation partielle du premier brin d'ARN déjà copié (Chen *et al.*, 2003).

La figure 7 schématise le processus de recombinaison virale. Nous avons dans un premier temps, une étape de formation des hétérozygotes, suivie de la génération de recombinants.

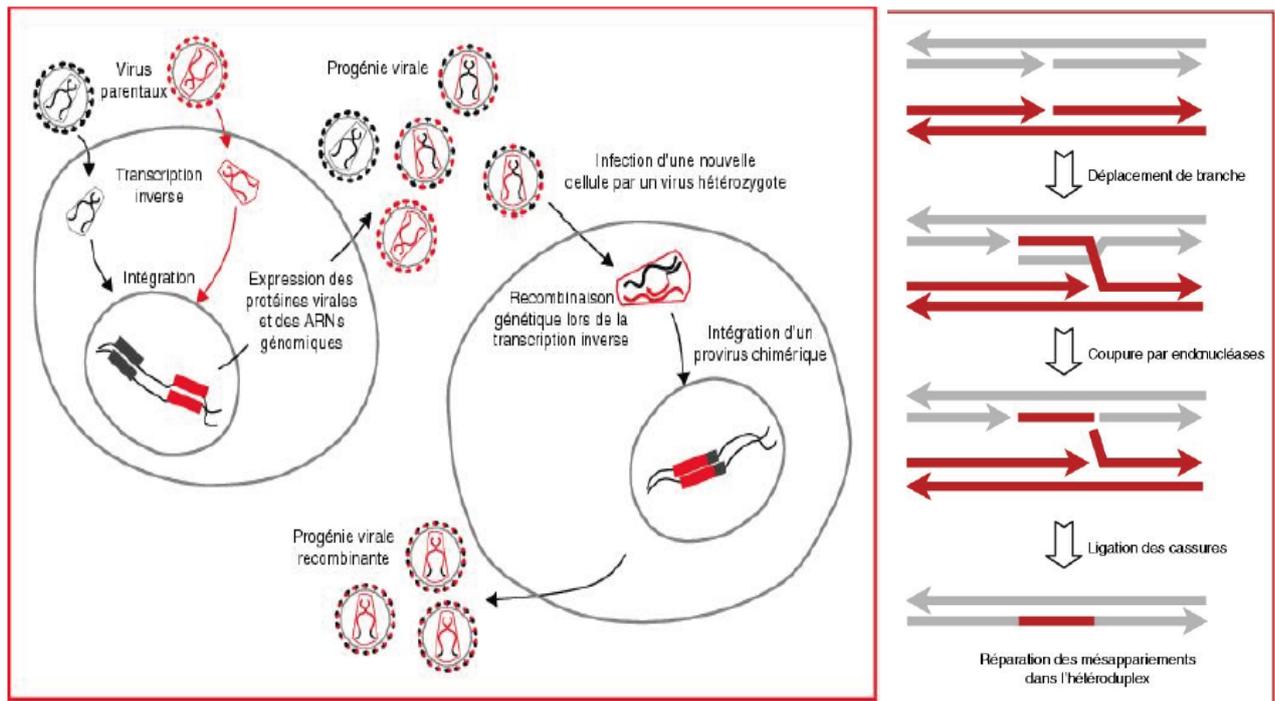


Figure 7. Schéma de la recombinaison génétique
(Pris de Simon-Lorière, *et al.*, 2006)

La conséquence la plus visible de la recombinaison est le nombre de plus en plus important de formes recombinantes circulantes CRFs (Circulating Recombinant Forms), favorisées par des doubles infections, particulièrement dans les zones où circulent plusieurs sous-types (Peeters et Sharp, 2000; Blackard *et al.*, 2002; Hoelscher *et al.*, 2002). Lorsque les génomes viraux co-emballés sont génétiquement différents, la recombinaison rétrovirale peut conduire à un brassage entre les génomes viraux (Neher et Leitner, 2010; Smyth *et al.*, 2012).

Aujourd'hui, la recombinaison est perçue comme partie intégrante du cycle infectieux du VIH, ce qui démontre qu'elle joue un rôle majeur dans l'évolution de ce rétrovirus et la progression de la maladie chez les patients (Liu *et al.*, 2002; Nájera *et al.*, 2002; Magiorkinis *et al.*, 2003; Rambaut *et al.*, 2004).

- **La capacité répllicative**: Le fitness est la capacité d'un virus à se répliquer dans un environnement donné. La variabilité du VIH est aussi liée à la dynamique de la réplication virale. On estime qu'une personne infectée par le VIH produit chaque jour environ 10^{10} nouveaux virus (Perelson *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998). La population virale homogène retrouvée chez une personne récemment infectée évolue au cours du temps. Elle conduit à l'apparition progressive d'un mélange complexe de variants appelé <quasi-espèces>.

- **La pression de sélection** : La diversité génétique est influencée par des pressions de sélection

diverses dont celles du système immunitaire de l'hôte et aussi celles dues au traitement antirétroviral.

En effet, parmi les millions de virus produits chaque jour, ne subsisteront que ceux ayant conservé à travers les différentes mutations leur capacité à se répliquer. Ainsi, seules les mutations n'altérant pas les propriétés fonctionnelles des protéines sont tolérées: on parle de pression négative. Les gènes *pol* et *gag*, qui sont les plus conservés, subissent généralement cette sélection négative (Kils-Hütten *et al.*, 2001; Barbour et Grant, 2005). Quant aux protéines de structure, qui sont exposées à la pression immunitaire, elles subissent une pression de sélection positive avec des substitutions d'acides aminés qui peuvent entraîner des changements de structure de la protéine (substitutions non-synonymes) et modifiant les épitopes viraux accessibles (Kuiken *et al.*, 1993). Ceci a pour conséquence l'échappement du virus aux mécanismes de défense de l'hôte. Cette forme de pression est en partie responsable de la grande variabilité du gène de l'enveloppe (Kuiken *et al.*, 1993).

Par ailleurs, le traitement antirétroviral exerce également une pression de sélection positive par destruction des virus sensibles favorisant l'apparition de variants résistants. En effet, lorsqu'un traitement antirétroviral est initié, une forte pression de sélection sera exercée sur le virus et les variants ayant la capacité de se répliquer en présence des ARVs auront un avantage évolutif évident. Lorsque le régime thérapeutique est sous-optimal pour contrôler la réplication du virus, il conduit à l'émergence de virus portant des mutations de résistance préexistantes du fait des erreurs de la TI (Metzner *et al.*, 2003; Martinez-Picado et Martínez, 2008).

III.2. Les variants génétiques du VIH

Le VIH, comme les autres lentivirus de primates, est caractérisé par une très grande diversité génétique. Comme décrit dans l'origine du VIH, il est aujourd'hui établi que plusieurs événements de transmission inter-espèces sont à l'origine des deux types de virus de l'immunodéficience humaine: le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1 est classé en quatre groupes distincts: le groupe M pour majeur d'une part et les groupes O (Outlier), N (New, Non-M/ Non-O) et P d'autre part. Chacun de ces groupes est le résultat d'une transmission indépendante d'un SIV de chimpanzé ou de gorille à l'Homme. Toutefois, ils sont inégalement répartis à travers le monde, car seul le groupe M est pandémique. La figure 8 ci-dessous montre les relations phylogénétiques entre les différents groupes du VIH-1, et les différents variants à l'intérieur du groupe M.

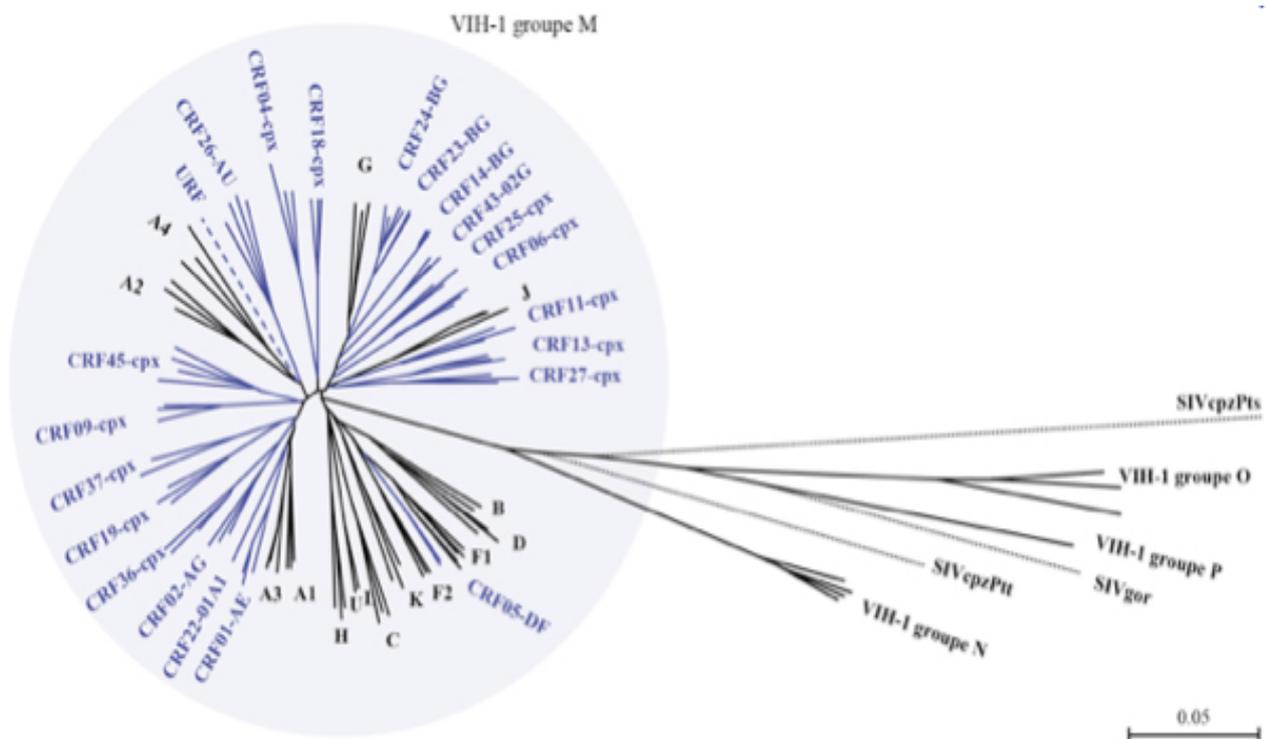


Figure 8. Arbre phylogénétique montrant les groupes du VIH-1 (pris de Peeters, 2013)

III.2.1. Diversité des variants du VIH-1

III.2.1.1 Le groupe M du VIH-1 (Major)

Le groupe M correspond aux virus les plus répandus dans le monde. Selon la diversité génétique observée au sein du génome viral, les isolats du VIH-1 groupe M sont classés en 9 sous-types (A-D, F-H, J et K) (figure 9). Ces derniers sont génétiquement distants d'environ 25 à 35% au niveau du gène *env*. Toutefois, la distance génétique peut varier selon le gène avec environ 9-11% dans le gène *pol* (Gao *et al.*, 1998; Roquebert *et al.*, 2009; Etienne et Peeters, 2010).

Certains sous-types sont classés en sous sous-types, car ils forment un embranchement distinct de celui définissant un sous-type, mais ils ne sont pas génétiquement assez distants pour justifier une différenciation en sous-types. La plupart de ceux identifiés à ce jour appartiennent au sous-type A (A1 à A4), dont le A3 qui a été identifié parmi les professionnelles du sexe au Sénégal, et au sous-type F (F1 et F2) (Gao *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2006; Buonaguro *et al.*, 2007). En 2009, une étude menée en Angola a identifié sur la base de séquences partielles deux groupes de séquences formant des groupements distincts au sein de la radiation du sous-type A, et qui pourraient définir de nouveaux sous sous-types A5 et A6 (Bártolo *et al.*, 2009). En RDC, des virus majoritairement constitués d'un sous sous-type A5 ont été caractérisés (Vidal *et al.*, 2009).

Les sous-types B et D ne sont pas génétiquement assez distants pour justifier d'être des sous-types différents. Mais la nomenclature du VIH-1 groupe M les a maintenus tels quels pour des raisons de simplicité (Robertson *et al.*, 2000).

- Les formes recombinantes du groupe M

La pandémie du VIH est caractérisée par la circulation de plusieurs sous-types génétiques. Elle est aussi caractérisée par une quantité extrêmement importante de recombinants inter sous-types. Dans les zones où co-circulent plusieurs types ou sous-types de VIH comme dans plusieurs pays d'Afrique, des co-infections ou des surinfections avec des sous-types ou CRFs différents peut avoir lieu et engendrer la formation de virus recombinants (Renjifo *et al.*, 1998). Certains recombinants ne sont retrouvés que chez un seul individu et sont appelés URF (Unique Recombinant Form). D'autres recombinants sont retrouvés chez au moins trois personnes non épidémiologiquement liées, ils sont appelés CRF (Circulating Recombinant Forms). Certains de ses recombinants sont appelés recombinants de deuxième génération, car ils sont composés de sous-types purs avec des recombinants déjà établis (Hemelaar, 2012). Le sous-type anciennement classé E sur la base de séquences partielles s'est avéré en réalité un recombinant qui fut par la suite appelé CRF01_AE (figure 9). Les isolats classés auparavant sous-type I étaient aussi des mosaïques complexes de plusieurs sous-types et sont devenus les CRF04_cpx (figure 9) (Worobey *et al.*, 2004). D'autre part, la souche IbNg d'Ibadan initialement considérée comme une lignée divergente du sous-type A est devenue la forme recombinante CRF02_AG (figure 9) (Carr *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). Le 65^{ème} CRFs a été publiés en Novembre 2013 (Feng *et al.*, 2013).

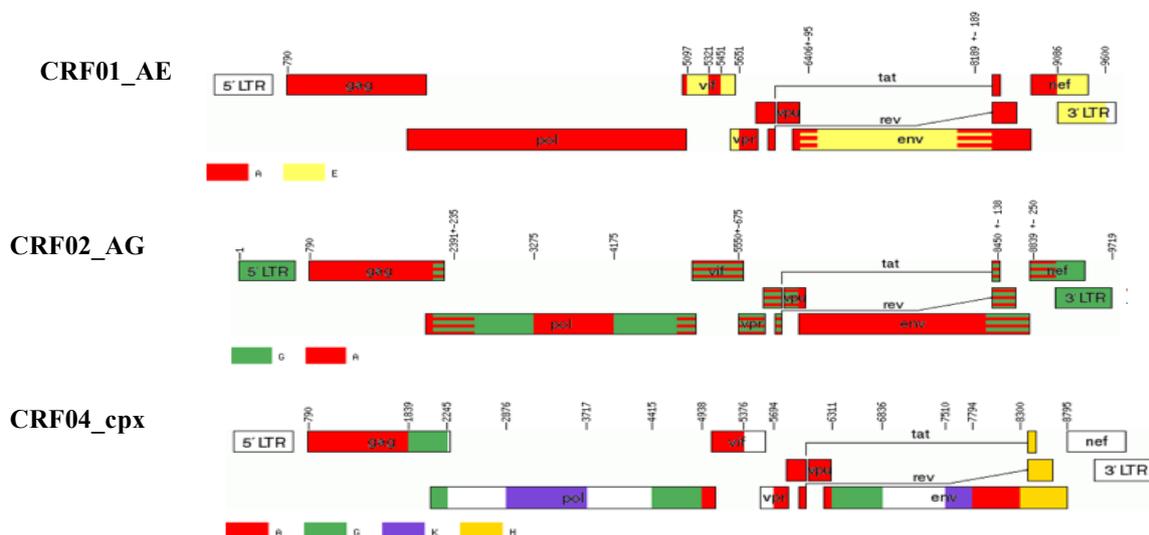


Figure 9. Représentation schématique des CRF01_AE, CRF02_AG et CRF04_cpx (<http://www.hiv.lanl.gov>, consulté le 24/10/13).

III.2.1.2. Les autres groupes du VIH-1

À côté de ces virus majoritaires, il existe au sein du VIH-1, d'autres souches génétiquement divergentes, ayant conduit à la définition des groupes O, N et P. Ces variants non-M ont tous été

décrits pour la première fois chez des patients d'origine camerounaise (De Leys *et al.*, 1990; Gürtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998; Plantier *et al.*, 2009). Ils sont généralement confinés au Cameroun qui constitue leur épicode, et dans les pays limitrophes.

Parmi ces trois groupes du VIH-1, **le groupe O** est le plus fréquent causant près de 1% des infections au Cameroun (Ayouba *et al.*, 2001). Sa propagation est limitée avec une endémie restreinte dans ce pays et dans les pays voisins. Cependant le groupe O a aussi été retrouvé dans l'ouest de l'Afrique dont le Sénégal avec quelques cas ponctuels (Peeters *et al.*, 1997, Ayouba *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été retrouvé dans certains pays du nord, avec aussi quelques cas sporadiques en Europe (Quiñones-Mateu *et al.*, 1998; Barin *et al.*, 2007) et aux Etats Unis (Sullivan *et al.*, 2000). Ces derniers avaient toujours des liens épidémiologiques avec le Cameroun ou les pays voisins.

La grande diversité génétique du groupe O est comparable à celle du groupe M dont il a 50% d'homologie dans le gène *env*, mais sa classification en sous-types reste néanmoins complexe (Gürtler *et al.*, 1994; Roques *et al.*, 2002). Quelques cas de recombinaison entre les groupes O et M du VIH-1 ont été décrits suggérant des co-infections avec des virus du groupe O et du groupe M (Peeters *et al.*, 1999; Vergne *et al.*, 2003; Vessière *et al.*, 2010).

Le groupe N du VIH-1 est représenté par une quinzaine de cas d'infection au Cameroun (Ayouba *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2006; Vallari *et al.*, 2010) et était restreint à cette région. En 2011, il a été décrit qu'un Homme vivant en France mais ayant voyagé au Togo avait été infecté par du VIH-1 groupe N. Cette contamination survenue au Togo suggère donc que le VIH-1 groupe N a franchi les frontières du Cameroun (Delaugerre *et al.*, 2011).

Quant au groupe P, il est le dernier groupe du VIH-1 identifié aussi au Cameroun où 2 cas seulement ont été documentés. Le premier cas a été décrit chez une femme originaire du Cameroun vivant en France (Plantier *et al.*, 2009). Le deuxième cas fut décrit à travers une étude rétrospective au Cameroun (Vallari *et al.*, 2011). Les virus du groupe P et ceux des virus SIV infectant les gorilles sont phylogénétiquement proches et constituent une lignée distincte des groupes M, N et O du VIH-1.

III.2.2. La diversité génétique du VIH-2

Alors que le VIH-1 groupe M est réparti à travers le monde, le VIH-2 est principalement confiné en Afrique de l'ouest avec comme épicode la Guinée-Bissau (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Chez les personnes infectées, il a été caractérisé comme étant moins pathogène que le VIH-1 (Kanki *et al.*, 1994). Aujourd'hui, le VIH-2 est subdivisé en huit groupes génétiques nommés de A à H dont le A et le B sont les plus répandus (Damond *et al.*, 2004; De Silva *et al.*, 2008). Le groupe A est

principalement retrouvé en Guinée-Bissau et aussi au Sénégal, tandis que le groupe B est plus présent en Côte d'Ivoire, au Mali et au Burkina-Faso (Schim van der Loeff et Aaby, 1999; Reeves et Doms, 2002; Tienen *et al.*, 2010). Les autres souches (C à H) sont représentées par des cas uniques (Gao *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997; Damond *et al.*, 2004) suggérant une très faible propagation. Des cas d'infection avec les groupes H et F ont été décrits en France et aux Etats Unies respectivement, chez des patients originaires d'Afrique de l'ouest (Damond *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2008).

En 2012, une autre séquence de VIH-2 différente de celles des 8 groupes déjà décrits a été isolée chez un enfant de 8 ans habitant un village proche du Parc National de Taï, en Côte d'Ivoire, suggérant un nouveau groupe de VIH-2 (Ayoubouba *et al.*, 2013).

Une seule recombinaison entre les sous-types A et B du VIH-2 (CRF01_AB) a été décrite chez des patients vivants au Japon (Ibe *et al.*, 2010). Des cas de doubles infections entre le VIH-1 et le VIH-2 ont été signalés, mais aucune forme de recombinaison entre les deux types de virus n'est signalée (Curlin *et al.*, 2004).

III.3. Répartition globale des variants du VIH-1 groupe M

III.3.1. Fréquences des sous-types et CRFs dans le monde

Les différents sous-types et recombinants du VIH-1 groupe M sont inégalement répartis dans le monde. Une analyse comparée sur les données décrites entre 2000 et 2007 montre de légères variations dans cette distribution dans le monde. Entre 2000-2003 et 2004-2007, le sous-type C reste le plus répandu dans le monde (figure 10), avec des proportions similaires (50% vs 48%) entre les deux analyses. Une évolution est toutefois notée chez d'autres variants, comme l'augmentation dans le temps, du CRF02_AG (5% vs 8%) (figure10). Une diminution est cependant notée avec le sous-type D (3% vs 2%).

La dernière analyse (données 2004-2007) montre qu'après le sous-type C, plus de 20% des infections dans le monde sont dues à des formes recombinantes. Parmi ces recombinants, le CRF02_AG représente 8% et le CRF01_AE 5%. Les autres sous-types sont aussi inégalement répartis. Le sous-type A représente 12% des infections, le B 11%, le G 5% (figure 10) (Hemelaar *et al.*, 2011).

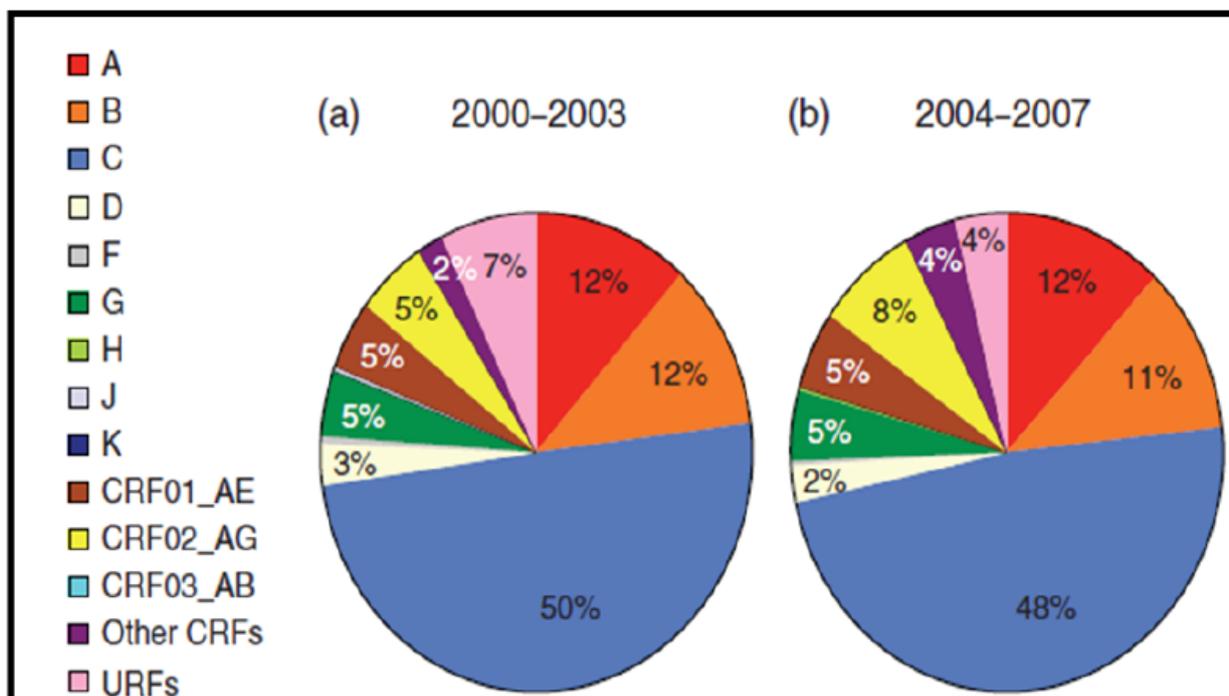


Figure 10. Répartition des variants de VIH-1 M entre 2000 et 2007 (pris de Hemelaar *et al.*, 2011).

III.3.2. Distribution globale des différents variants

Plusieurs études ont montré que les différents sous-types et recombinants du VIH sont inégalement répartis à travers les différentes régions du monde (figure 11) (Peeters *et al.*, 2003; Carr *et al.*, 2010).

III.3.2.1. Répartition en Afrique

Le continent Africain est l'épicentre d'une très grande diversification du VIH-1. Tous les sous-types et de nombreux CRFs du VIH-1 précédemment décrits sont présents sur le continent, avec des proportions différentes selon les régions.

Dans l'Est et le Sud de l'Afrique, les sous-types A, C et D sont prédominants et co-circulent avec leurs recombinants (figure 11). Dans les pays comme le Botswana, l'Ethiopie, le Lesotho, Malawi, Mozambique, la Zambie, Swaziland et l'Afrique du Sud, le sous-type C est quasiment exclusif. Il est associé au sous-type A majoritaire au Rwanda et en Tanzanie. Au Kenya, le sous-type A est majoritairement retrouvé dans les études. Quant en Uganda, les sous-types A et D sont les plus prévalent. (Hemelaar *et al.*, 2011; 2012; Lihana *et al.*, 2012).

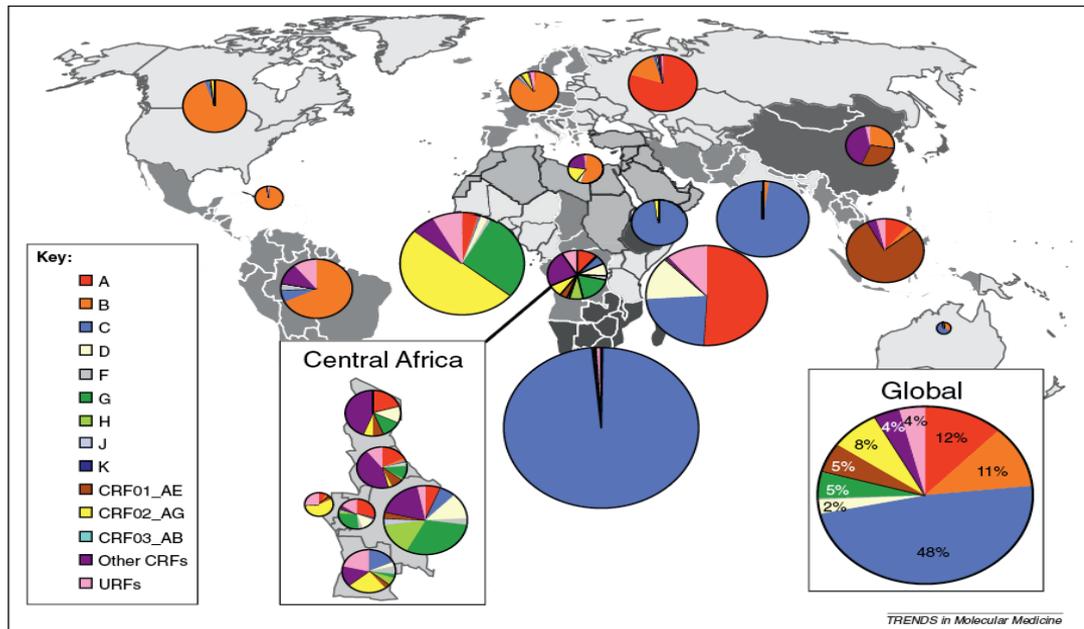


Figure 11. Distribution globale des sous-types et CRFs du VIH-1 dans le monde
(pris de Hemelaar *et al.*, 2011)

En Afrique Centrale, la répartition est spécifique à chaque région (figure 11). La République Démocratique du Congo est décrite comme épicerie du VIH-1 groupe M. En effet, des études ont montré que, 20 ans avant que l'épidémie de SIDA ne soit reconnue, une très grande diversité génétique du VIH-1 était déjà observée à Kinshasa. Deux souches ancestrales des sous-types D et A ont été identifiées dans un sérum et dans une biopsie collectés en 1959 et 1960 (Zhu *et al.*, 1998; Worobey *et al.*, 2008). Le sous-type A y est prédominant, mais une diminution progressive de sa prévalence est notée du nord (53%) au sud (46%), au profit du C majoritaire dans le sud du pays (Vidal *et al.*, 2009; Lihana *et al.*, 2012). Au Cameroun, Guinée Equatoriale et Gabon, le CRF02_AG est prédominant et co-circule avec plusieurs autres variants (Lihana *et al.*, 2012). Une importante circulation de recombinants URFs et de virus non identifiables est enregistrée en Afrique centrale (Lihana *et al.*, 2012).

Pour le Nord de l'Afrique, en Algérie, Maroc, Egypte, le sous-type B est prédominant (figure 11), mais le CRF02_AG est aussi présent en Tunisie et dans le sud de l'Algérie (Hemelaar *et al.*, 2011; Lihana *et al.*, 2012).

En Afrique de l'Ouest, les sous-types A, G, CRF02_AG et CRF06_cpx sont les plus fréquents (figure 11). Le CRF02_AG est prédominant au Togo (51%), Ghana (66%), Gambie (47%), Mali (72%), Côte d'Ivoire (88%) et au Bénin (66%). Au Niger et au Burkina Faso, le CRF02_AG

constitue avec le CRF06_AG les formes génétiques les plus prévalentes. Au Nigeria, les A, G et CRF02_AG sont prédominants selon les régions du pays (Hemelaar *et al.*, 2011; Lihana *et al.*, 2012).

Au Sénégal le CRF02_AG reste majoritairement (plus de 60%) retrouvé dans la population générale (Toure-Kane *et al.*, 2000; Diop-Ndiaye *et al.*, 2010; Kebe *et al.*, 2013; Thiam *et al.*, 2013). Cependant, le sous-type C a été majoritairement retrouvé dans le groupe des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (Ndiaye *et al.*, 2009).

III.3.2.2. Répartition dans les autres continents

Dans les pays industrialisés, notamment l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud, l'Europe, l'Australie et les Caraïbes, le sous-type B reste prédominant depuis le début de l'épidémie (Hemelaar *et al.*, 2011). Il peut représenter des fréquences de plus de 80% de l'ensemble des souches circulant dans ces régions (Wensing *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2010). Cependant, en Europe de l'Est, le sous-type A est majoritairement retrouvé (Vinogradova *et al.*, 2010). Quant au Sud de l'Amérique, les sous-types B et F co-circulent avec de nombreux CRF B/F (Pando *et al.*, 2008; Vázquez-Valls *et al.*, 2010).

Toutefois, il est important de remarquer que dans ces régions, surtout en Europe, les sous-types non-B augmentent de façon progressive. En effet, il a été décrit que la proportion des non-B parmi les nouvelles infections en France est passé de 10% en 1998 à 50% en 2005 (Semaille *et al.*, 2007). Les variants non-B sont estimés à 19% entre 1993 et 2008 en Italie (Lai *et al.*, 2010) et 12% dans une cohorte de patients naïfs en Espagne (González-Alba *et al.*, 2011). Cependant, les nouvelles infections en Grèce sont dominées par le sous-type A (Nikolopoulos *et al.*, 2008). Les sous-types A, C, D, F, G, H, CRF01_AE et CRF02_AG ont été décrites chez les femmes enceintes immigrées d'Afrique sub-saharienne au Canada et les militaires de l'armée Américaine (Singer *et al.*, 2010). Quant au Brésil, l'émergence du C est décrite dans le sud, prenant le dessus sur le sous-type F qui prédominait dans ces régions. Des recombinants B/C dont le CRF31_BC ont aussi été documentés dans le sud du Brésil (Simon *et al.*, 2010; De Medeiros *et al.*, 2011).

En Asie, le CRF01_AE est prédominant avec les sous-types B et C (Hemelaar, 2012; Rerks-Ngarm *et al.*, 2010). Dans les pays du sud-est, comme le Cambodge, le Vietnam et la Thaïlande, le CRF01_AE est largement prédominant (Wirachsilp *et al.*, 2007). Le sous-type C est majoritaire en Inde (Deshpande *et al.*, 2009). Quant à la Chine, l'épidémie est caractérisée par une prédominance du CRF07_BC associée au CRF01_AE (Lu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

En fonction des pays donc, la diversité génétique du VIH-1 décrite dans la population générale peut différer, mais reste semblable à celle retrouvée chez les HSHs, avec cependant, des proportions plus ou moins différentes.

III.3.3. Distribution des variants génétiques chez les HSHs

Dans l'étude de Beyrer *et al* en 2012, des données sur les sous-types et recombinaunts pour des échantillons de HSH entre 2007-2011 étaient disponibles pour 14 pays. Parmi ces pays, figurent au moins trois pays d'Afrique et d'autres pays de l'Amérique, de l'Asie et de l'Europe de l'Ouest. La figure 12 montre la répartition des sous-types et CRFs du VIH-1 dans les 14 pays inclus dans cette étude. Pour le Nord et le Sud de l'Amérique et pour l'Europe occidentale, les souches circulantes chez les HSHs sont comparables à celles des populations générales (figure 12). Tout comme dans la population générale, le sous-type B reste prédominant chez les HSHs malgré la description de plus en plus de variants non-B en Europe (Habekova *et al.*, 2010; Leoz *et al.*, 2011; Beyrer *et al.*, 2012; Chibo et Birch, 2012). Des études réalisées en Europe, UK et USA ont décrit d'importants clusters ou chaînes de transmission chez les HSHs, suggérant donc l'existence de réseaux de diffusion entre ces HSHs (Hughes *et al.*, 2009).

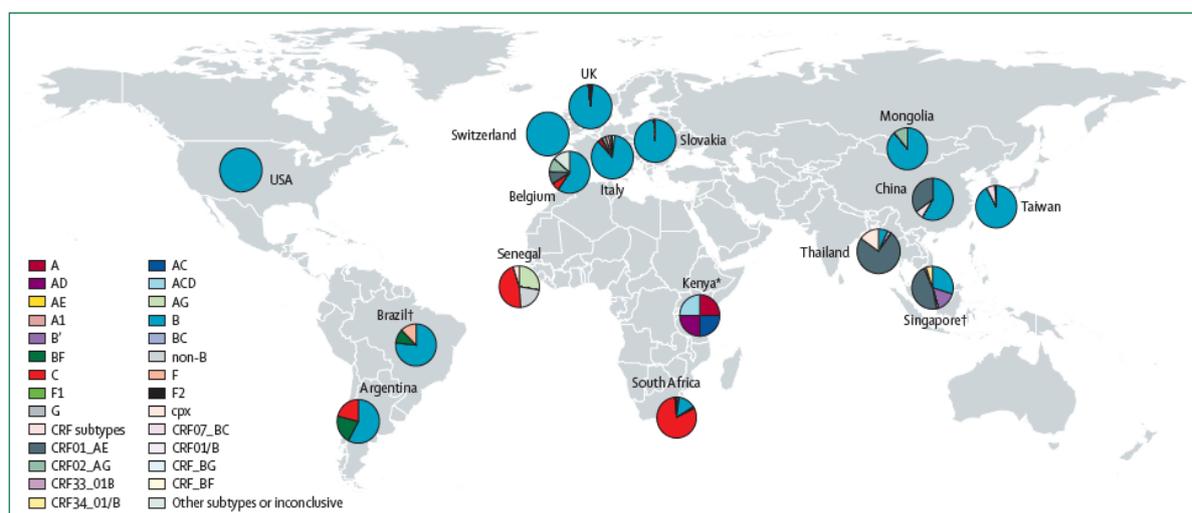


Figure 12. Epidémiologie moléculaire des sous-types/CRFs du VIH-1 chez les HSHs, 2007-2011 (pris de Beyrer *et al.*, 2012).

Pour l'Afrique, les données chez les HSHs sont limitées à celles de l'Afrique du Sud, du Kenya et du Sénégal dans l'étude de Beyrer *et al.*, 2012. Les variants circulant dans cette population sont les mêmes que ceux de la population générale mais dans des proportions différentes (Beyrer *et al.*, 2012). Cela suggère une diffusion locale des virus entre les populations dans chaque zone. A Cape Town en Afrique du Sud, dans la population multiethnique HSH et les communautés environnantes, une ségrégation précoce des sous-types du VIH par race et par groupe à risque a été signalée dans les années 1980, avec une fréquence importante du sous-type B chez les HSHs de race blanche, tandis que le C était majoritaire chez les Sud-africains hétérosexuels. En effet, le sous-type C a été identifié dans 92% des HSH noirs et 36% des HSHs blancs, suggérant de substantiels ponts entre ces populations.

Pour l'Asie, la situation est un peu plus complexe avec la présence du sous-type B (prédominant en Mongolie, Beijing en 2007, et à Taiwan) mais aussi de souches non-B comme le CRF01_AE prédominant en Thaïlande, à Singapour et en augmentation en Chine (Beyrer *et al.*, 2012).

Cette grande diversité du VIH pourrait avoir des conséquences importantes sur le pouvoir pathogène, le diagnostic, la thérapie antirétrovirale et la recherche vaccinale.

III.5. Conséquence et implication de la diversité génétique du VIH

III.5.1. Conséquences sur la progression et la transmission de la maladie

- Impact sur la progression

L'impact de la diversité génétique du VIH sur la progression de la maladie se traduirait par des différences influençant la réplication virale et la pathogénicité du virus. Cependant, de nombreux facteurs comme la durée de l'infection par le VIH ou le niveau de réplication virale peuvent biaiser l'estimation de l'association entre types, sous-types et pathogénicité. En effet, une étude Ougandaise a permis de montrer que le temps d'évolution jusqu'au stade SIDA était plus court chez les patients porteurs du sous-type D (Kiwanuka *et al.*, 2008). C'est le cas d'autres études, menées en Tanzanie et au Kenya qui ont montré une progression moins rapide du sous-type A par rapport au D (Vasan *et al.*, 2006; Baeten *et al.*, 2007). Une étude conduite au Sénégal avait montré que des femmes infectées par les sous-types non-A (C, D et G) avaient plus de chance de développer rapidement un SIDA que celles infectées par le sous-type A (Kanki *et al.*, 1999). Par contre, d'autres études n'ont pas montré de différence sur la progression de la maladie (Alaeus *et al.*, 1999; Laurent *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2011). Ceci suggère que les facteurs qui sont impliqués dans la progression restent mal connus. Une étude menée en Europe a montré qu'en l'absence d'ARV, les patients infectés avec le sous-type D avaient une baisse du taux de CD4 quatre fois plus importante par rapport à d'autres sous-types comme A, B, C et CRF02_AG, qui présentaient des baisses similaires l'un à l'autre (Easterbrook *et al.*, 2010). Aussi, la progression de la maladie était moins rapide chez les personnes infectées par le VIH-2 que par le VIH-1 (Marlink *et al.*, 1994; MacNeil *et al.*, 2007). D'autre part, des études ont montré que pendant les stades tardifs de la maladie, des souches de tropisme X4 ont été retrouvées dans une forte proportion (60-77%) chez des personnes infectées par des sous-types (A, B, D, CRF01_AE et CRF02_AG) contre seulement 15% chez des personnes infectées par du sous-type C (Esbjörnsson *et al.*, 2010).

- Impact sur la transmission

Des différences de taux de transmission ont été décrites selon les sous-types du VIH-1. En effet, une étude réalisée en Ouganda a révélé que le sous-type A avait un taux plus élevé de transmission hétérosexuelle que le sous-type D (Kiwanuka *et al.*, 2009). Une autre étude réalisée

en Tanzanie avait montré que le sous-type C était fortement associé à un risque de transmission mère-enfant, comparé aux sous-types A ou D (Renjifo *et al.*, 2004). Une autre étude réalisée chez des femmes enceintes au Kenya a montré le sous-type C était plus présent dans la cavité vaginale que les sous types A ou D (John-Stewart *et al.*, 2005). Ce dernier semble avoir une plus forte prédisposition pour la localisation dans la muqueuse génitale féminine (Walter *et al.*, 2009), ce qui peut faciliter leur transmission à la fois par la voie verticale ou hétérosexuelle.

Cependant d'autres études n'ont pas trouvé de différence significative sur les risques de transmission mère-enfant avec les sous-types A, D ou C (Krivine *et al.*, 2009). Cela suggère que d'autres études sont nécessaires pour établir des conclusions sur le risque relatif de transmission par des sous-types différents du VIH.

Par ailleurs, de la même façon que sur la progression de la maladie, des études ont décrit que la transmission du VIH-2 était moindre que celle du VIH-1, d'où sa faible expansion (Popper *et al.*, 1999). En effet, la structure génomique des deux virus est la même, mais seuls 40% d'homologie sont partagés par les gènes de leurs enveloppes. La différence pourrait être au niveau des protéines responsables de l'entrée du virus dans les cellules hôtes.

III.5.2. Impact de la diversité sur le diagnostic et le suivi des PVVIHs

- Diagnostic sérologique

La diversité des VIH est à l'origine de risque de fausse négativité pour le diagnostic sérologique basé sur la recherche d'anticorps. Les premiers tests de dépistage développés sur la base du VIH-1 de sous-type B étaient moins efficaces car ils ne détectaient pas bien les séroconversions avec les autres sous-types du VIH (Apetrei *et al.*, 1996; Louie *et al.*, 2008) Il existe aujourd'hui des tests beaucoup plus sensibles capables de détecter tous les sous-types du VIH-1 du groupe M connus, le groupe O et le VIH-2 (Kwon *et al.*, 2006; Zeh *et al.*, 2011). Cependant, ces méthodes avancées ne sont pas souvent disponibles dans les pays à ressources limitées où la plupart des nouvelles infections se produisent. En 2012, un test sensible et spécifique pour le diagnostic et la surveillance de l'infection par le VIH-O avait été mis en place. Ce dernier semblait être simple, abordable et adapté à une utilisation dans tous les pays où les VIH groupes O et M co-circulaient (Gueudin *et al.*, 2012).

- Monitoring des patients sous traitement ARV

Cette diversité génétique a des implications importantes sur la mesure de la charge virale des patients vivant avec le VIH. Il a été montré qu'avec l'utilisation des tests de premières générations, il existait des risques de sous-quantification de la charge virale des sous-types non-B (notamment A, G et CRF02_AG) (Amendola *et al.*, 2002; Delaugerre *et al.*, 2009), et une absence de quantification chez les patients infectés par le groupe O (Gueudin *et al.*, 2003). Tout comme le diagnostic

sérologique, ces tests étaient développés sur la base du VIH-1 de sous-type B. Par la suite, le monitoring des PVVIHs a été amélioré par la mise au point d'autres techniques de PCR en temps réel couvrant à la fois le VIH-M et le VIH-O (Rodriguez *et al.*, 2009; Rouet *et al.*, 2010; Church *et al.*, 2011; Depatureaux *et al.*, 2011).

Malgré ces améliorations, des évaluations réalisées entre les tests les plus utilisés ont montré qu'aucun des tests n'arrivait à couvrir la totalité des variants du VIH-1. Des discordances de charge virale peuvent être retrouvées parmi les tests actuellement utilisés (Peeters *et al.*, 2010; Rouet *et al.*, 2010). Récemment, un test de RT-PCR en temps réel relativement peu coûteux et capable de détecter et de quantifier toutes les formes circulantes du VIH-1, SIVcpz et SIVgor a été développé (Etienne *et al.*, 2013). Ce dernier pourrait ainsi surveiller les souches du VIH-1 qui circulent actuellement tout en détectant une nouvelle émergence de SIVcpz et SIVgor chez l'homme. Toutefois, une évaluation de ce test sur un plus grand panel d'échantillons est essentielle, afin de s'assurer qu'il détecte bien tous les variants circulants, surtout dans les pays à ressources limitées.

III.5.3. Conséquences de la diversité sur le traitement ARV

La diversité génétique du VIH peut influencer les types et fréquences des mutations de résistance qui pourraient éventuellement apparaître lors de l'exposition aux ARVs (Brenner et Coutsinos, 2009; Wainberg et Brenner, 2012). Plusieurs études à travers le monde ont démontré que les différents sous-types du VIH-1 groupe M ont des sensibilités similaires aux ARVs, qui sont pourtant développés sur la base du sous-type B (Kantor, 2006). La plupart des mutations de résistance du sous-type B sont également présents dans les sous-types non-B, mais plusieurs autres mutations se produisent dans ces derniers. C'est le cas de la mutation de résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) V106M qui est sélectionnée par les sous-types C et CRF01_AE, et pas par le sous-type B. C'est aussi le cas de la mutation de protéase L891V qui se produit dans les sous-types C, F et G, mais pas dans le sous-type B (Martinez-Cajas *et al.*, 2009). Des différences remarquables sont aussi notées parmi les sous-types non-B. Par ailleurs, il a été décrit que *in vitro*, à l'exposition au tenofovir, la mutation K65R était très rapidement sélectionnée par le sous-type C comparé au B (Brenner *et al.*, 2006). Des études sur la PTME ont montré une grande disparité dans la résistance à la névirapine selon les sous-types. Des fréquences plus élevées de résistance ont été trouvées chez les femmes infectées par les sous-types C comparées au D et A (Toni *et al.*, 2005; Eshleman *et al.*, 2006).

Il est aussi important de noter que le VIH-2 et le VIH-1 groupe O sont naturellement résistants aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) (Quiñones-Mateu *et al.*, 1998; Tuailleon *et al.*, 2004; Lal *et al.*, 2005). Cette résistance est liée à l'existence de la

substitution C181Y dans la RT (Descamps *et al.*, 1997; Depatureaux *et al.*, 2011).

Malgré cette grande diversité génétique, dans l'ensemble, le traitement ARV reste bénéfique pour les PVVIHs. Cependant, les différences observées sur les mécanismes et profils des mutations peuvent avoir une incidence sur la résistance croisée et la sélection de traitements de deuxième ligne (Kantor, 2006; Ntemgwa *et al.*, 2009).

III.5.4. Impact de la diversité sur la recherche vaccinale

L'intervention idéale pour contrôler la pandémie du VIH est un vaccin préventif qui soit sûr, simple, très efficace mais surtout abordable. Il est toutefois reconnu que la diversité du VIH est l'un des freins majeurs au niveau mondial, dans le développement de vaccin efficace contre le virus (Hemelaar, 2012). La diversité génétique du VIH-1 est à l'origine de la variabilité antigénique des spicules de l'enveloppe du VIH-1. Ainsi, les anticorps neutralisant des protéines d'enveloppe d'un sous-type du VIH-1 peuvent ne pas neutraliser une autre souche, car les antigènes de surface sont différents et ne sont donc pas reconnus par le système immunitaire (Roquebert *et al.*, 2009). Plusieurs essais cliniques de vaccins thérapeutiques ont été menés avec des approches incluant des antigènes du gène *gag* (Li *et al.*, 2011), *Tat* (Caputo *et al.*, 2009), la protéine Gp160 (Gudmundsdotter *et al.*, 2008) et les cellules dendritiques dérivées de monocytes (García *et al.*, 2011). Il est aujourd'hui reconnu que du fait de cette extrême diversité du VIH, l'induction d'anticorps pouvant neutraliser la grande variété de souches était particulièrement difficile. Habituellement, un vaccin efficace exige de puissantes réponses anticorps, capable de bloquer l'infection et/ou d'éliminer l'agent pathogène (Plotkin, 2010). Pour ce qui est du VIH, un vaccin efficace devrait induire des anticorps ciblant le grand nombre des souches virales actuelles.

Récemment, avec les avancées technologiques, de nouvelles stratégies ont permis d'isoler de nombreux anticorps ayant un pouvoir neutralisant couvrant deux à trois fois plus de souches de VIH (Georgiev *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2013). L'espoir est permis grâce aux résultats d'un essai récent dans des modèles animaux, utilisant des anticorps neutralisants larges et puissants appelés *bNAbs* (*broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies*), pouvant protéger contre le VIH-1 et supprimer une infection déjà établie. Le succès de l'immunothérapie passive dans les modèles animaux suggère que ces *bNAbs* pourraient devenir un ajout précieux à l'arsenal contre le VIH-1 (Klein *et al.*, 2013).

Plusieurs techniques ont été développées pour identifier les génotypes des souches de VIH circulant chez les personnes infectées. Parmi ces méthodes, les plus importantes utilisent la biologie moléculaire. Beaucoup de méthodes ont été développées pour étudier la diversité virale du VIH, mais seules celles qui sont utilisées dans cette thèse ont été développées en détails.

III.6. Quelques outils de détermination et d'analyse de la diversité génétique du VIH.

III.6.1. Le Séquençage nucléotidique et la phylogénie permet de déterminer les variants majoritaires

III.6.1.1. Le séquençage

Parmi ces méthodes, le séquençage nucléotidique par la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) suivi d'une analyse phylogénétique est la méthode de référence et la plus couramment utilisée. La méthode de Sanger est basée sur l'utilisation de terminateurs de chaîne qui sont marqués par différents fluorophores selon les bases nucléotidiques et qui, lorsqu'ils sont incorporés au cours de la synthèse, entraînent l'arrêt de l'élongation. La dernière base portant le fluorochrome peut donc être détectée grâce à sa fluorescence émise sous l'excitation d'un laser. Ainsi dans un séquenceur, les produits de réactions de séquence vont subir une électrophorèse à très haut voltage dans un gel permettant la séparation des molécules à une base près, donnant la succession des nucléotides dans la séquence.

III.6.1.2. Analyses phylogénétiques

Des analyses phylogénétiques qui comparent des séquences de gènes ou de fragments de gènes sont souvent utilisées pour déterminer la diversité des souches. Il existe aujourd'hui différents logiciels qui sont disponibles pour réaliser des alignements de séquences générées contre des souches de référence (Procter *et al.*, 2010) comme ClustalX2.0 (Larkin *et al.*, 2007), Mega5 (Tamura *et al.*, 2011) et Seaview (Gouy *et al.*, 2010). Ces mêmes logiciels permettent aussi de construire des arbres phylogénétiques. Les relations d'évolution entre des gènes homologues sont illustrées par des arbres phylogénétiques dont les feuilles constituent les taxons qui représentent les séquences étudiées parfois appelées OTU (operational taxonomic unit), les nœuds internes représentent un hypothétique ancêtre commun aux taxons. Un groupe de taxons partageant la même branche a une origine monophylétique et est appelé clade. Les arbres peuvent être enracinés (comparent les taxons les uns par rapport aux autres) ou sans direction imposée dans le processus d'évolution. Si la phylogénie contient un taxon connu pour être le plus ancien, l'arbre peut être enraciné et ce dernier est défini comme « outgroup ».

Il existe plusieurs méthodes pour construire un arbre et ces méthodes d'inférence phylogénétique peuvent être divisées en deux catégories:

- **Les méthodes de distances** mesurent la dissemblance entre chaque paire d'OTU afin de produire une matrice de distances appariées généralement obtenues à partir d'un alignement. Elles comprennent plusieurs méthodes dont la méthode du plus proche voisin ou *neighbor-joining* (NJ) (Studier et Keppler, 1988; Saitou et Nei, 1987), qui est l'une des méthodes de distances la plus

utilisée (Ye *et al.*, 2012).

- **Les méthodes de caractère** regroupent toutes celles qui se basent sur un alignement pour inférer une phylogénie. Parmi ces derniers, nous avons :

Les méthodes de parcimonie expliquent l'alignement avec le moins de substitutions possibles (Fitch, 1971). Plusieurs arbres sont générés et la longueur de chaque arbre est égale à la somme du nombre de changements de caractère pour chacun des sites informatifs. L'arbre impliquant le minimum d'évènements évolutifs est l'arbre avec le maximum de parcimonie.

A côté, nous avons les méthodes basées sur un modèle d'évolution explicite qui sont actuellement les plus utilisées en biologie en raison de leur fiabilité.

Les méthodes du maximum de vraisemblance (*maximum likelihood, ML*) (Felsenstein, 1981) sont des méthodes probabilistes qui calculent une probabilité conditionnelle (la vraisemblance) exprimant le fait d'observer l'alignement suivant un modèle d'évolution particulier et une phylogénie particulière. Leur but est de choisir la phylogénie et les paramètres du modèle d'évolution qui maximisent la vraisemblance, contrairement aux méthodes de distances où c'est le plus souvent l'utilisateur qui choisit les valeurs des paramètres du modèle d'évolution. Le logiciel PhyML (Guindon et Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2010) qui est l'un des plus utilisés est basé sur ce principe pour inférer des phylogénies.

La méthode bayésienne est une autre méthode de caractère très proche des méthodes de vraisemblance. Elle est fondée sur le théorème de BAYES qui combine la probabilité d'un arbre (probabilité *a priori*) avec la vraisemblance d'observer les données considérées (probabilité *a posteriori*) (Rannala et Yang, 1996). Cette méthode produit un ensemble d'arbres dont l'information phylogénétique peut être résumée en calculant l'arbre consensus majoritaire. Les probabilités postérieures sont donc indiquées pour chaque nœud de l'arbre consensus et représentent la probabilité qu'un clade soit vrai étant donné un modèle d'évolution et le jeu de données considéré (Huelsenbeck et Ronquist, 2001). Les nœuds qui apparaissent de façon fréquente dans la collection d'arbres auront une probabilité *a posteriori* forte alors que ceux apparaissant peu auront une faible probabilité *a posteriori*. La différence fondamentale entre les méthodes bayésiennes par rapport aux méthodes de vraisemblance est que les paramètres suivent une distribution qui est donnée *a priori* par l'utilisateur. Le logiciel MrBayes (Ronquist et Huelsenbeck, 2003) qui fait partie des programmes de phylogénie les plus utilisés permet d'inférer des arbres phylogénétiques sous ce principe.

- Détermination de la fiabilité d'un arbre phylogénétique

La fiabilité des arbres phylogénétiques peut être testée par différentes méthodes statistiques, en se focalisant sur les branches internes utilisées lors de l'inférence d'arbres phylogénétiques.

La plus répandue est le calcul du *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Cette technique utilise le ré-échantillonnage aléatoire pour générer un grand nombre (souvent 1000) d'alignements bruités constitué d'une succession de sites choisis aléatoirement parmi ceux de l'alignement de départ. Des phylogénies sont ensuite calculées sur la base de ces alignements bruités avec les mêmes paramètres que pour la phylogénie initiale. Le support statistique attribué à chaque clade de la phylogénie de départ correspond au nombre de fois où ce clade est trouvé dans les réplicats bruités. Plus le signal phylogénétique est fort, plus le support de *bootstrap* est élevé et il est communément admis qu'un support de *bootstrap* supérieur à 70-80% est fiable statistiquement (Guindon *et al.*, 2010).

Une autre méthode appelée aLRT (approximate Likelihood-ratio test) comparable aux autres méthodes d'évaluation de la fiabilité des branches a été proposée (Anisimova et Gascuel, 2006). Cette technique a l'avantage d'être très rapide efficace et est implémentée dans PhyML (Guindon *et al.*, 2010).

Les tests génotypiques conventionnels ne détectent pas les variants minoritaires qui sont présents dans de très faibles proportions (moins de 20 %). Aujourd'hui, il est possible de détecter ces derniers grâce aux techniques de séquençage à haut-débit.

III.6.2. Les nouvelles techniques permettent d'étudier les variants minoritaires

III.6.2.1. La Multi-Hybridization Assay (MHA)

La MHA a été décrite depuis 2002 pour un génotypage plus rapide et plus efficace des variants présents en cas de co-infection. Elle a été utilisée avec les sous-types A, C, D et leurs recombinants en Afrique de l'Est (Hoelscher *et al.*, 2002), puis les sous-types B, C et le recombinant CRF01_AE en Asie (Kijak *et al.*, 2007), les sous-types B, F et leurs recombinants B/F en Amérique du Sud (Teixeira *et al.*, 2010) et dernièrement avec le B, G et CRF02_AG au Portugal (Freitas *et al.*, 2013). Pour caractériser la majorité des variants circulant en Afrique de l'Ouest et du Centre ainsi que les taux de co-infections, cette MHA a été adaptée par Vidal *et al* pour identifier les sous-types A, B/D, C, F, G et CRF22_01A1, CRF02_AG et CRF06_cpx qui constituent la très grande majorité des virus circulant dans ces régions (Vidal *et al.*, 2013).

- Principe de la MHA

Le principe de la MHA repose sur des amplifications séparées par PCR en temps réel en présence de sondes spécifiques aux variants du VIH-1 pour lesquels des sondes ont été dessinées.

Elle consiste à effectuer, à partir d'un produit de 1^{er} round, une PCR nichée en temps réel en présence de sondes fluorescentes spécifiques des variants du VIH-1. Les sondes sont doublement marquées par 2 fluorophores: un «Reporter (donneur)» en 5' et un «Quencher (accepteur)» en 3'. Ce dernier a la propriété de pouvoir absorber la fluorescence émise par le «reporter» lorsque la sonde est intacte car le phénomène de transfert d'énergie est dépendant de la distance entre les deux fluorophores. Lors de la PCR en temps réel, si la sonde est accrochée sur le produit en cours d'amplification à l'étape d'hybridation, elle serait dégradée au cours de l'élongation par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase. Cette dégradation entraîne un éloignement du Reporter et du Quencher et par conséquent, la fluorescence émise par le reporter pourra donc être détectée. Les infections multiples sont matérialisées par l'émission de fluorescence de plusieurs sondes.

- *Technique de la MHA*

La MHA consiste à effectuer, à partir d'un produit de 1^{er} round de PCR, des PCR nichées en temps réel en présence des sondes fluorescentes spécifiques des variant VIH-1.

Chaque échantillon est traité de façon séparée avec les différentes sondes sur chaque région du génome. En raison des coûts des sondes, le premier round d'amplification peut être suivi d'un second round de PCR nichée en temps réel sans sonde pour vérifier la présence d'ADN du VIH-1 dans les produits de premier round. Il peut aussi être suivi par la PCR en temps réel avec la sonde à tester. Les PCR nichées avec ou sans la présence de sonde sont réalisées avec des machines de PCR en temps réel permettant de visualiser les résultats avec un ordinateur relié à l'appareil.

III.6.2.2. La SGA permet d'isoler les séquences des variants minoritaires

Cette technologie est une autre méthode d'étude de la diversité des virus et permet d'isoler à la fois les variants majoritaires et minoritaires. Le principe de cette méthode repose sur le séquençage à partir de dilutions d'ADN complémentaire (ADNc), de molécules uniques des variants infectant un individu. Elle consiste à réaliser, dans un premier temps, plusieurs dilutions de l'ADNc pour rechercher celle qui donne au maximum 30% de PCR positives, suggérant qu'ensuite chacun des amplicons obtenus provient d'une molécule unique. Ces essais se font avec une fenêtre de dilutions comprises entre 0,5 et 10 copies/ul de l'ADNc. Une fois cette dilution obtenue, plusieurs amplifications sont réalisées sur une plaque à 96 puits et puis toutes les PCRs positives sont séquencées. L'identification des variants minoritaires est faite après correction et élimination de toutes les séquences qui portent des doubles pics (correspondant à des doubles populations de virus), suivies d'une analyse phylogénétique.

III.6.2.3. Le pyroséquençage, une autre méthode d'études des variants minoritaires

Une autre méthode de séquençage de plus en plus utilisée est le pyroséquençage qui suit les mêmes étapes que celle de Sanger mais avec une révélation immédiate d'où le nom séquençage en temps réel. Dans le pyroséquençage, les nucléotides sont ajoutés un à un dans le milieu réactionnel. Si celui qui est ajouté ne correspond pas à celui attendu, il est éliminé immédiatement. Un autre nucléotide est ajouté dans le milieu réactionnel jusqu'à ce qu'il corresponde à celui attendu et il est incorporé. Cette incorporation entraîne l'émission d'un signal lumineux qui est capté par une caméra CCD (Charge Coupled device) et reproduit un chromatogramme. Cette méthode est utilisée par le «*deep sequencing*» (Metzker, 2010).

Le séquençage classique ne permet pas d'identifier les souches minoritaires présentes parmi les quasi-espèces virales, (qui peuvent porter des mutations associées à une résistance aux ARV), ou qui en cas de co-infection peuvent être des sous-types ou CRFs différents de celui du virus majoritaire. Par conséquent, même si la SGA permet d'isoler les variants minoritaires, la MHA constitue une méthode sensible et spécifique pour identifier rapidement sur un grand nombre d'échantillons des doubles infections avec des souches différentes.

La plus grande diversité du VIH-1 se trouve en Afrique où tous les sous-types et de nombreuses formes recombinantes ont été décrits. La propagation mondiale des différents sous-types et recombinants du VIH-1 suit un modèle de distribution très complexe et dynamique. Les explications sur les modes actuels de distribution sont probablement multifactorielles. Elles comprennent la croissance démographique, l'urbanisation, l'évolution des transports et la migration entre autres. Toutefois, la mobilité humaine est un facteur clé dans cette propagation (Tatem *et al.*, 2006; Stoddard *et al.*, 2009). A côté du comportement des individus, les facteurs structurels et sociaux tels que la pauvreté, la stigmatisation etc., ont un impact notable sur la pandémie du VIH, notamment en Europe et en Asie centrale.

Par ailleurs d'autres facteurs actuels comme les effets fondateurs jouent aussi un rôle important. En effet, les groupes à risques sont plus exposés à l'infection que le reste de la population. Ils jouent un rôle déterminant dans la diffusion de l'épidémie de SIDA par le biais de ces événements fondateurs. Ces derniers correspondent à la diffusion rapide d'un variant au sein d'un groupe, lequel peut après se répandre dans la population générale. Parmi les populations à risques, nous avons les hommes et femmes consommateurs de drogues injectables (IDU pour *intravenous drug users*). Par conséquent, l'échange de seringues contaminées peut être à l'origine de la diffusion des virus au sein de cette population. Certains d'entre eux s'adonnent à la prostitution afin d'avoir des revenus pour se procurer de la drogue et peuvent ainsi servir de pont envers la population générale. De la même

façon, les HSH bisexuels ont souvent plusieurs partenaires sexuels dont des partenaires féminines qui peuvent aussi servir de pont envers la population générale et contribuer à la diffusion des virus. C'est le cas également des professionnel (le) s du sexe (PS) (ou CSW pour *commercial sex workers* ou parfois FSW pour *female sex workers*). Par conséquent, la criminalisation de la profession du sexe, les représailles et la stigmatisation sociale envers les HSHs ainsi que l'usage de drogues constituent un frein majeur dans la lutte contre le VIH/SIDA.

Une fois que la transmission de ces nombreux virus ait lieu, la cinétique de l'infection peut être divisée en trois phases successives au cours desquelles les manifestations cliniques, virologiques et immunologiques diffèrent. Ces 3 phases sont la primo-infection, la phase de latence clinique (asymptomatique) et la phase SIDA précédant la mort.

III.7. Physiopathologie de l'infection à VIH/SIDA

- **L'infection primaire** correspond à la période située entre la transmission et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique contre le virus. Bien que certains individus soient asymptomatiques durant cette période, jusqu'à 90% des personnes infectées développent des syndromes grippaux passagers. La phase de primo-infection est accompagnée d'une réplication virale intense détectable dans le sang à partir de la troisième semaine post-infection. La réplication massive du virus dans les lymphocytes T CD4+ entraîne leur destruction durant l'infection primaire. L'infection primaire induit cependant l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique contre le VIH-1. Par conséquent, grâce à l'action des cellules T cytotoxique CD8+ (CTL), la virémie diminue drastiquement (figure 13).

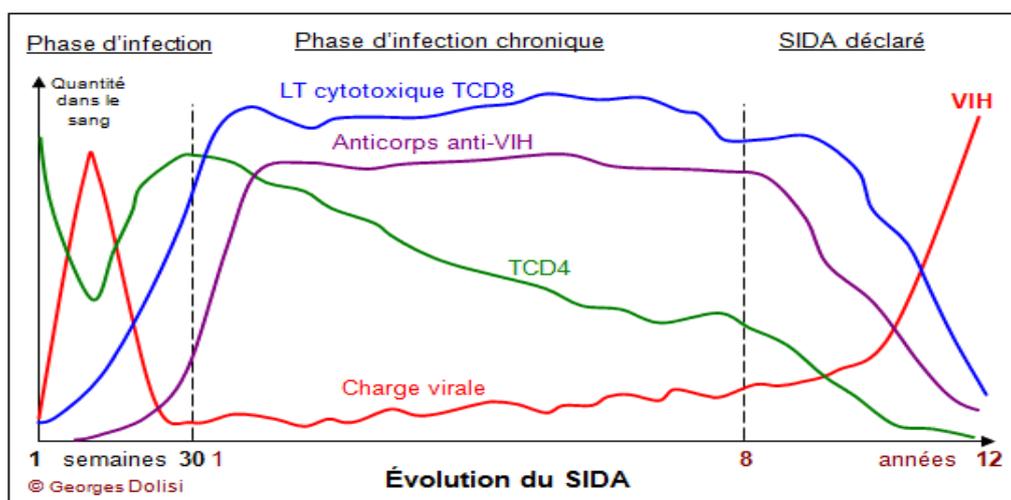


Figure 13. Les différentes phases d'évolution du VIH.

(http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_evolution.htm).

- **La phase de latence clinique**: après la primo-infection, l'individu infecté entre dans un état de latence clinique, encore appelé phase asymptomatique. Un certain équilibre entre le virus et le système immunitaire se maintient pendant plusieurs années sans affecter de manière visible la santé du patient séropositif. Les anticorps anti-VIH sont alors produits en grande quantité et serviront de marqueurs dans le diagnostic de l'infection à VIH. Ce temps de latence est très variable d'un individu à un autre et reste néanmoins progressif. De manière remarquable, certains individus contrôlent l'infection pendant des années sans que le virus ne prenne le dessus. Ces sujets sont qualifiés d'asymptomatiques à long terme (ALT) (en anglais Long Term Non-Progressors). L'équilibre se maintient jusqu'à ce que le VIH-1 prenne progressivement le dessus sur l'organisme et la persistance de l'infection aura ainsi comme conséquence l'émergence et/ou la sélection des virus mutants qui échappent à la réponse immune de l'hôte.

- **La phase SIDA** apparaît au moment de l'effondrement du système immunitaire et de l'augmentation de la virémie. Ce stade, le plus grave de l'infection, se caractérise par l'apparition des premiers symptômes associés (fatigue, perte de poids, présence de ganglions, des diarrhées et de la fièvre) et le développement de maladies opportunistes et de néoplasies graves touchant diverses parties du corps. Les infections opportunistes les plus courantes sont la pneumonie à *Pneumocystis carini*, les infections à cytomégalovirus, les infections fongiques comme les candidoses orales, les infections mycobactériennes à *Mycobacterium tuberculosis*, et les néoplasmes malins comme les lymphomes ou sarcomes de Kaposi.

Ces trois phases constituent l'histoire naturelle de l'infection à VIH qui se documente de moins en moins grâce à l'utilisation des molécules antirétrovirales dans le traitement.

Chapitre IV: Le traitement antirétroviral et résistance du VIH aux ARVs

A l'échelle individuelle, les antirétroviraux ont pour objectif principal d'empêcher la progression vers le SIDA en maintenant ou en restaurant un nombre de lymphocytes TCD4 $> 500/\text{mm}^3$ (Revillard, 2001). Pour atteindre ce but, il doit rendre la charge virale plasmatique indétectable (< 50 copies/mL) (Launay, 2008).

Selon leurs domaines d'action, les médicaments anti-rétroviraux en circulation et/ou en étude peuvent être divisés en classes et ciblent différentes étapes du cycle de réplication du VIH (Arts et Hazuda, 2012). La figure 14 montre les différentes cibles du traitement ARV en fonction du cycle de réplication du VIH. Les premières classes d'ARVs ont pour cible la transcriptase inverse et la protéase. Puis les dernières classes ont pour cibles la fixation et la fusion de l'enveloppe, l'intégration et aussi, la maturation de la particule virale nouvellement produite (figure 14).

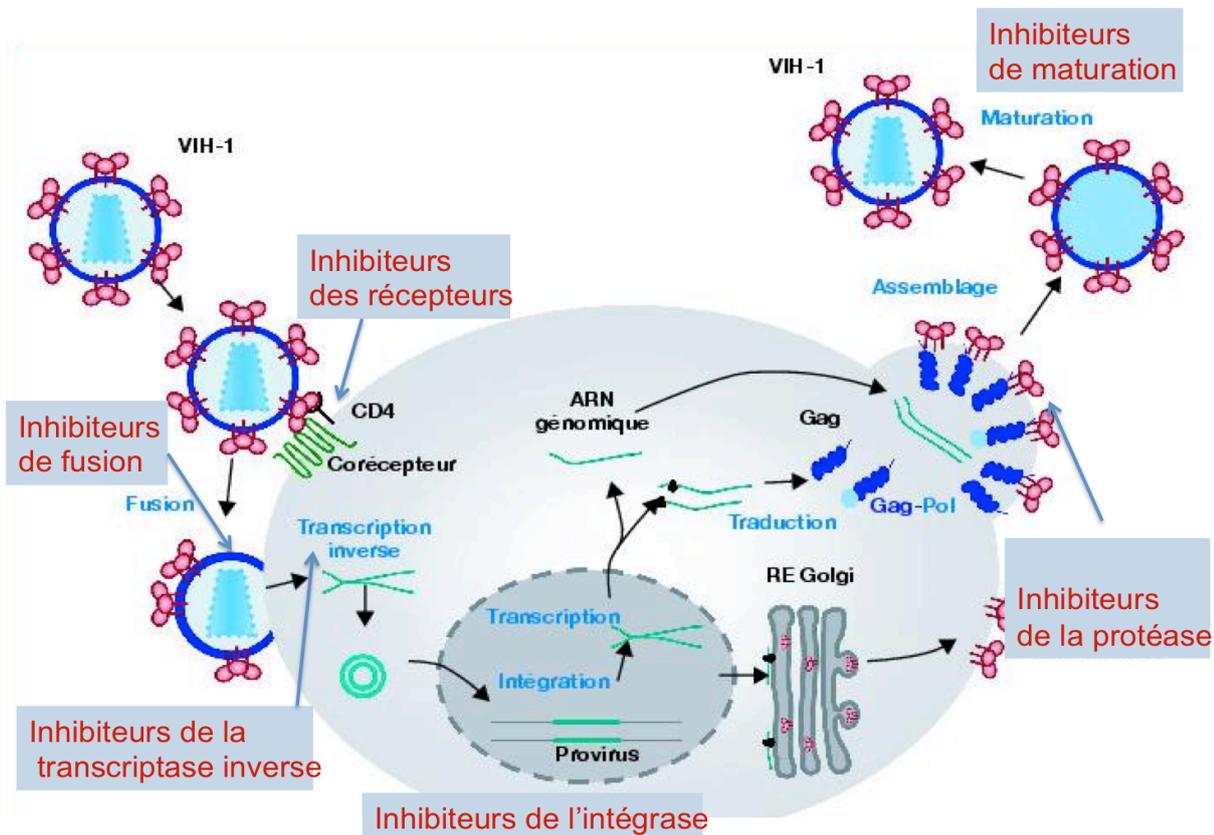


Figure 14. Cibles du traitement antirétroviral selon le cycle de réplication (Adapté de Bauby *et al.*, 2008).

IV.1. Classes et mécanismes d'action des ARVs

IV.1.1. Les inhibiteurs de la Transcriptase Inverse (TI)

IV.1.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la TI (INTI).

La RT est la première cible pharmacologique pour combattre le VIH. Actifs sur le VIH-1₅₈

et le VIH-2, les INTI constituent la première classe d'ARV mis sur le marché et développés dès 1985, dont la molécule la plus ancienne est l'AZT (Azidothymidine) (Nakashima *et al.*, 1986). Ce sont des analogues des nucléosides naturels qui agissent par inhibition compétitive avec ces derniers. Les INTI sont des prodrogues qui subissent une triphosphorylation intracellulaire. Quant aux analogues nucléotidiques, ce sont des composés de synthèse organophosphorés qui subissent une biphosphorylation conduisant à des dérivés agissant au niveau du site actif de la RT. Par l'absence du groupement hydroxyle en position 3', les ARVs de cette classe bloquent l'élongation par la TI, ce qui conduit à un ADN incomplet et non fonctionnel (Basavapathruni *et al.*, 2004). Pour cette classe d'ARVs, plusieurs molécules séparées (AZT, 3TC, FTC, D4T, TDF, ABC et DDI) sont disponibles. Dans le but de réduire le nombre important de comprimés dans la trithérapie et renforcer l'adhésion des patients, des combinaisons à doses fixes de deux ou de trois médicaments ont été développées. Parmi elles, nous avons la Combivir encore appelé Duovir (AZT + 3TC), le Truvada (TDF + FTC), le Kivexa (ABC + 3TC), le Tenolam (TDF + 3TC) et le Trizivir (AZT + 3TC + ABC).

IV.1.1.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la TI (INNTI).

Les ARVs de cette classe agissent comme inhibiteurs non compétitifs de la TI en se fixant sur le site catalytique, dans une petite poche hydrophobe, proche du site actif de l'enzyme induisant une diminution de son efficacité catalytique. Ce sont des inhibiteurs très sélectifs qui n'ont pas besoin d'être phosphorylés. Les premières générations d'INNTI sont l'éfavirenz (EFV ou Sustiva), la névirapine (NVP ou Vuramine) et la délavirdine (DLV ou Rescriptor qui n'est plus commercialisé). Cependant, une des limites à leur utilisation est leur faible barrière génétique (nombre de mutations requises pour que le virus devienne résistant) associée à un niveau de résistance croisée élevé. Par conséquent, une seconde génération d'INNTI a vu le jour une décennie après avec l'étravirine (Intelence) et la ripilvirine (Sax, 2007; Schiller et Youssef-Bessler, 2009). Ces INNTI de seconde génération ont une barrière génétique plus élevée. Ils permettent donc de traiter les patients dont ceux qui sont résistants aux INNTI de première génération. Ce sont de très puissants inhibiteurs, mais ils sont inactifs sur la plupart des souches du VIH-1 groupe O et du VIH-2 (Tuailon *et al.*, 2004).

Des combinaisons à doses fixes de trois inhibiteurs de la transcription inverse (INTI + INNTI) ont aussi été mises en place avec le Triomune (d4T + 3TC + NVP) et l'Atripla (TDF + FTC + EFV) ce qui permet de réduire le nombre de comprimé par prise.

Le tableau III ci-dessous montre les antirétroviraux actuellement disponibles pour les 6 grandes classes.

Tableau III. Liste des antirétroviraux actuellement approuvée par la FDA.

(<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>, mise à jour: 08/20/2013)

Nom de marque	Non générique	Date d'approbation
Inhibiteurs nucléosidique de la transcriptase Inverse		
Retrovir	zidovudine, azidothymidine, AZT, ZDV	09-mars-87
Hivid	zalcitabine, (n'est plus commercialisé)	ddC 19-juin-92
Videx	didanosine, ddi EC	31-octobre-00
Videx	didanosine, dideoxyinosine, ddi	09-octobre-91
Combivir	lamivudine + zidovudine	27-septembre-97
Emtriva	emtricitabine, FTC	02-juillet-03
Epivir	lamivudine, 3TC	17-novembre-95
Epzicom	abacavir + lamivudine	02-aout-04
Trizivir	abacavir + zidovudine + lamivudine	14-novembre-00
Truvada	tenofovir + emtricitabine	02-aout-04
Viread	tenofovir, TDF	26-octobre-01
Zerit	stavudine, d4T	24-juin-94
Ziagen	abacavir, ABC	17-décembre-98
Inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase Inverse		
Edurant	rilpivirine	20-mai-11
Intelence	etravirine	18-janvier-08
Rescripto	delavirdine, DLV	04-avril-97
Sustiva	efavirenz, EFV	17-septembre-98
Viramune	nevirapine, NVP	21-juin-96
Viramune XR	nevirapine, NVP	25-mars-11
Inhibiteurs de la protéase		
Agenerase	amprenavir, (n'est plus commercialisé)	APV 15-avril-99
Aptivus	tipranavir, TPV	22-juin-05
Crixivan	indinavir, IDV	13-mars-96
Fortovase	saquinavir (n'est plus commercialisé)	07-novembre-97
Invirase	saquinavir, SQV	06-décembre-95
Kaletra	lopinavir + ritonavir, LPV/RTV	15-septembre-00
Lexiva	Fosamprenavir, FOS-APV	20-octobre-03
Norvir	ritonavir, RTV	01-mars-96
Prezista	darunavir	23-juin-06
Reyataz	atazanavir, ATV	20-juin-03
Viracept	nelfinavir, NFV	14-mars-97
Inhibiteurs de fusion		
Fuzeon	enfuvirtide, T-20	13-mars-03
Inhibiteurs du co-recepteur CCR5		
Selzentry	maraviroc	06-aout-07
inhibiteurs de l'intégrase		
Isentress	raltegravir	12-octobre-07
Tivicay	dolutegravir	13-aout-13

IV.1.2. Les inhibiteurs de la Protéase (IP)

Les IP sont apparus en 1995 et sont des molécules beaucoup plus puissantes et plus actives sur le VIH-1 et le VIH-2. Ce sont des peptidomimétiques qui se fixent de manière compétitive sur le site actif de la protéase virale. Ils l'empêchent ainsi de catalyser le clivage des polyprotéines du virus. La maturation protéique étant donc altérée, les virions formés sont inactifs et non infectieux (Park *et al.*, 1993).

Le métabolisme principal des IP est réalisé majoritairement au niveau hépatique, par une iso-enzyme du cytochrome P 450. L'inhibition de cette dernière par une faible dose de Ritonavir (qui est aussi un IP) permet un ralentissement du métabolisme de l'IP qui lui est associé. Par conséquent, la concentration plasmatique et le temps de demi-vie de ce dernier sont alors augmentés, on parle alors d'IP boostés par le Ritonavir en un seul comprimé (Lichterfeld *et al.*, 2003).

Les molécules de cette classe sont utilisées dans les premières lignes de traitement dans les pays industrialisés. Cependant, vu leur coût, elles sont réservées aux secondes lignes pour les pays à ressources limitées.

IV.1.3. Les nouvelles classes antirétrovirales

IV.1.3.1. Les inhibiteurs de l'entrée du virus dans sa cellule cible.

L'entrée du VIH est une étape importante du cycle de réplication du VIH et constitue donc une cible thérapeutique de choix. Les inhibiteurs de ces classes bloquent l'entrée du VIH dans de nouveaux lymphocytes en agissant sur les mécanismes de fixation du virus et de la fusion des membranes virale et cellulaire.

- **Les inhibiteurs de fusion** bloquent la fusion de la membrane du virus avec celle de la cellule hôte. Ils se lient à la portion extracellulaire de la cellule, inhibant ainsi l'entrée virale post-attachement (Kuritzkes *et al.*, 2004). L'Enfuvirtide (T-20 ou Fuzéon) qui est la seule molécule de cette classe actuellement commercialisée se fixe par compétition au sous domaine HR2 de la gp41. Elle mime une portion répétée de cette dernière, empêchant ainsi la formation du paquet en hélices (Qadir et Malik, 2011). Cette dernière permet l'exposition de la partie N-terminale de la gp41 et l'insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire qui est une étape cruciale pour la fusion des membranes virales et cellulaires. Le T-20 est surtout utilisé chez les patients multirésistants en échec thérapeutique. Cependant, en dehors de son coût très élevé, le T20 nécessite une administration par injection sous-cutanée. Il peut donc provoquer des réactions allergiques sur les zones d'injection (Ball et Kinchelov, 2003; Lazzarin *et al.*, 2003). Par conséquent, d'autres molécules de cette classe ont été développées et sont en cours d'étude. Ces dernières peuvent agir soit en se fixant sur le récepteur CD4 (cas du BMS-488043) ou entraînent les virus à se fixer sur eux (PRO 542) ou sont

des anticorps anti-CD4+ bloquant l'attachement du virus à la cellule (TNX-355) (Jacobson *et al.*, 2004; Kuritzkes *et al.*, 2004; Hanna *et al.*, 2011). Récemment, le CP32M qui est un inhibiteur de fusion nouvellement conçu possédant une puissante activité anti-VIH, en particulier contre les souches résistantes au T20, a été décrit (Yao *et al.*, 2012).

- **Les inhibiteurs du CCR5** bloquent l'entrée de certains virus (Tozzi *et al.*, 2006) en agissant par un mécanisme allostérique non compétitif. La liaison entre les inhibiteurs de CCR5 et le corécepteur perturbe la conformation de sa boucle extracellulaire (ECL) qui ne peut plus interagir avec la boucle V3 de la gp120, nécessaire à l'entrée du virus. Ils empêchent par conséquent l'attachement du virus à la surface cellulaire (Dragic *et al.*, 2000; Tsamis *et al.*, 2003). Plusieurs molécules sont développées, mais seul le Maraviroc (MVC ou Celsentri) a été approuvé en août 2007. Son efficacité en cas d'échec de première ligne a été démontré par plusieurs études (Gulick *et al.*, 2008; Dumond *et al.*, 2009). Cependant, les limites de cette molécule sont qu'elle n'agit que sur les souches à tropisme R5. Elle peut donc constituer un risque d'échec et d'émergence des souches X4 préexistantes (Shafer et Schapiro, 2008). Il existe des molécules qui inhibent l'entrée des virus X4 tel que d-APACs (Hegde *et al.*, 2007) mais elles ne sont pas pour le moment mises en circulation.

IV.1.3.2. Les inhibiteurs de l'intégrase du virus.

Ces antirétroviraux ont pour rôle d'inhiber l'intégration du provirus dans le chromosome cellulaire bloquant ainsi une étape essentielle de sa pathogénicité. Plusieurs familles d'inhibiteurs de l'IN ont été identifiées et peuvent agir soit sur la fixation de l'ADN cible, ou sur celle de l'ADN viral ou encore en modifiant l'état oligomérique de l'IN (Witvrouw *et al.*, 2004; McColl et Chen, 2010). La seule molécule de cette classe approuvée en 2007 est le Raltégravir (RAL ou Isentress) qui est un inhibiteur de transfert de brin de l'ADN proviral sur le génome cellulaire avec une efficacité prouvée chez des patients ayant déjà reçu un traitement ARV (Pace et Rowley, 2008; Stellbrink, 2009; Quashie *et al.*, 2012).

Une deuxième génération d'inhibiteurs de l'intégrase comme l'Elvitegravir (GS 9137) et dolutégravir (S/GSK1349572) sont maintenant à différents stades de développement clinique (Ghosh *et al.*, 2011; Quashie *et al.*, 2012).

IV.1.3.3. Les inhibiteurs de maturation

Cette nouvelle classe thérapeutique d'ARV en cours de développement comporte des molécules qui agissent au cours de la maturation, à un stade tardif de la production virale qui est indispensable à la maturation des protéines du virus et à l'assemblage des particules virales. Elles inhibent le clivage du précurseur gag au niveau de la jonction de la protéine de capsid (CA) et la

protéine SP1 (p24/p2). La Bevirimat (BVM) est la seule molécule inhibitrice de la maturation virale dont l'efficacité a été démontrée (Wainberg et Albert, 2010; Keller *et al.*, 2011).

Plus d'un quart de siècle, après l'approbation du premier médicament antirétroviral aux États-Unis soit l'AZT, une multitude de médicaments antirétroviraux sont disponibles et proviennent de différentes classes. Toujours en évolution, les traitements ARV sont de moins en moins toxiques, plus accessibles et les stratégies d'utilisation se multiplient pour une efficacité de plus en plus importante. Avec la mise en place des HAART et l'arrivée des combinaisons d'ARV, le pronostic de l'infection chez les PVVIHs a changé radicalement au point de transformer le SIDA en une maladie chronique.

IV.2. Traitement ARV dans les pays à ressources limitées : recommandations de l'OMS

L'introduction des HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), qui consiste à associer au moins 3 molécules d'ARVs, a permis une amélioration du pronostic vital des patients vivant avec le VIH. Toutefois, les avancées n'ont pas permis d'éradiquer complètement l'infection chez les patients traités. Ces difficultés sont liées à plusieurs facteurs dont la persistance des réservoirs viraux latents, l'émergence des résistances associée aux ARVs ainsi que d'autres facteurs. Par conséquent, une mise au point de nouvelles classes thérapeutiques reste toujours nécessaire (Tozzi *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2011). Par ailleurs, le traitement est désormais reconnu comme étant un outil performant de réduction du risque de transmission du VIH en réduisant la charge virale (De Cock *et al.*, 2009; Garnett *et al.*, 2012).

Depuis 2002, des recommandations notamment sur le traitement antirétroviral, le diagnostic et les soins de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent ont été élaborés sous plusieurs lignes directrices. Les dernières datant de 2013 visent à combiner et à harmoniser l'ensemble des lignes directrices, notamment celles de 2010. Elles sont basées sur une approche de santé publique pour une utilisation plus élargie des ARV pour le traitement et la prévention de l'infection à VIH, en mettant l'accent plus particulièrement sur les pays à ressources limitées. Comme décrit par l'organisation mondiale de la santé (OMS) dans <les Lignes directrices combinées sur l'utilisation des antirétroviraux pour le traitement et la prévention de l'infection à VIH> en juin 2013, elles recommandent:

- Un traitement ARV plus précoce, débutant chez toute personne VIH-1 positive dont le taux de CD4 est inférieur ou égal à 500 cellules/mm³, avec priorité aux patients présentant une infection à VIH sévère ou qui sont à un stade avancé et à ceux ayant un taux de CD4 inférieur ou égal à 350 cellules/mm³;
- De commencer un TAR quel que soit le nombre de CD4 chez les personnes vivant avec le VIH

présentant une tuberculose active, une co-infection par le virus de l'hépatite B (VHB) avec une atteinte hépatique chronique sévère, les partenaires séropositifs dans les couples sérodiscordants, les femmes enceintes et les femmes allaitant au sein ainsi que les jeunes enfants âgés de moins de cinq ans.

- Une première ligne de TAR doit être composée de deux INTI plus un INNTI. L'option privilégiée recommandée chez l'adulte, la femme enceinte, la femme allaitant au sein et l'enfant âgé de trois ans et plus pour débiter un TAR est TDF + 3TC (ou FTC) + EFV en association à dose fixe. Si cette option est contre-indiquée ou n'est pas disponible, il est recommandé d'utiliser l'une des options suivantes : AZT + 3TC + EFV ou AZT + 3TC + NVP ou TDF + 3TC (ou FTC) + NVP.
- De cesser l'utilisation de la stavudine (d4T) dans les schémas de première intention en raison de ses effets toxiques métaboliques bien connus.
- D'utiliser chez les personnes recevant un TAR en plus du suivi clinique et du nombre de CD4, la mesure de la charge virale comme approche privilégiée pour le suivi du succès du TAR et le diagnostic de l'échec thérapeutique.
- Le TAR de deuxième ligne pour l'adulte doit être composé de deux INTI plus un inhibiteur de la protéase (IP) potentialisé par le ritonavir. Après échec d'un schéma thérapeutique de première ligne à base de TDF + 3TC (ou FTC), utiliser AZT + 3TC comme base d'INTI pour les traitements de seconde ligne. Après échec avec l'association AZT ou d4T + 3TC, utiliser TDF + 3TC (ou FTC) comme base d'INTI en deuxième intention.

Dans les pays à revenu faible et intermédiaire, le nombre de personnes qui bénéficient d'un traitement ARV a considérablement augmenté. La figure 15 montre l'évolution du nombre de patients arv entre 2003 et 2012. A la fin de l'année 2012, 9,7 millions de personnes vivant avec le VIH dans ces pays bénéficiaient du traitement ARVs, soit une augmentation de 1,6 millions par rapport à l'année 2011. Cette dernière est la plus importante jamais enregistrée et concerne principalement la région Africaine (OMS, 2013).

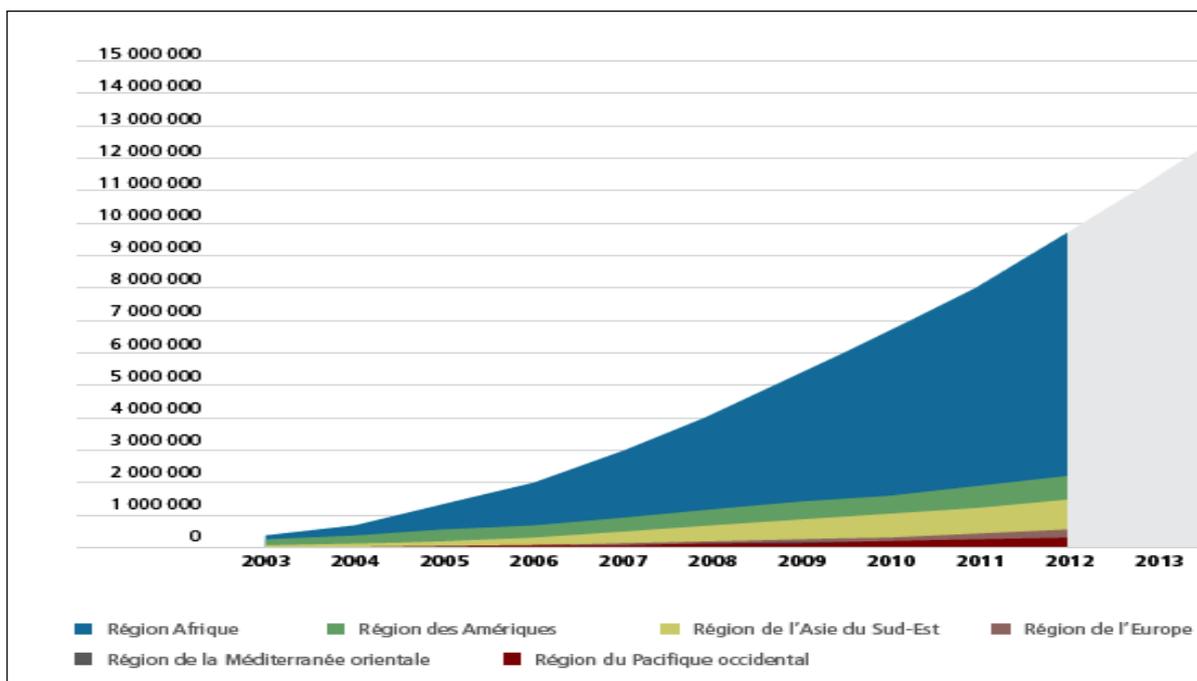


Figure 15. Nombre d'adultes et d'enfants bénéficiant d'une thérapie antirétrovirale dans les pays à revenu faible et intermédiaire 2003–2012. (OMS, 2013)

Toutefois, le meilleur moment pour débiter un traitement antirétroviral reste toujours en cours de discussion. En effet, d'après les recommandations de la commission internationale de la société antivirale aux USA (International Antiviral Society-USA panel), tous les adultes infectés par le VIH devraient être mis sous traitement ARV indépendamment du nombre de cellules CD4. Cette recommandation est basée sur des données de cohorte observationnelles et d'essai contrôlé randomisé montrant qu'un traitement ARV précoce réduit le risque de transmission du VIH, tout en offrant un bénéfice clinique aux personnes traitées. Cependant, lors de la mise sous ARV, certains éléments doivent être pris en compte. L'éducation pour l'adhésion ainsi que le soutien devraient être offerts. Le patient doit être prêt à commencer son traitement et doit être disposé à y adhérer (Thompson *et al.*, 2012). La bonne adhésion du patient à son traitement ARV par la prise régulière et aux bonnes doses des médicaments (observance) est indispensable pour un succès thérapeutique. Ce traitement ARV étant à vie, lorsqu'il n'est pas bien entrepris, le risque d'émergence de virus résistants devient inévitable avec comme conséquence un échec du traitement.

IV.3. L'échec thérapeutique

L'échec du traitement ARV est défini par une persistance de la répllication virale en dépit du traitement ARV. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de cet échec. Ce dernier est identifié par la survenue de manifestations cliniques témoignant de l'évolution de la maladie (échec clinique), qui précède une diminution du taux de lymphocytes TCD4+ (échec immunologique) qui survient après

une augmentation de la charge virale plasmatique du patient (échec virologique).

Associée à d'autres facteurs qui peuvent dépendre du virus (sa sensibilité aux ARVs...), de l'hôte (physiologie...) ou du Traitement ARV (pouvoir antiviral, interactions médicamenteuses, effets indésirables...), une mauvaise observance reste la première cause d'échec du traitement ARV. Un échec thérapeutique sera au mieux documenté par une mesure de la charge virale, mais la constatation d'un échec clinique et immunologique permettra d'affirmer l'échec de la première ligne de traitement.

Une fois cet échec thérapeutique confirmé, le traitement de relais mis en place est appelé traitement de deuxième ligne. Cependant, avant de passer à un traitement de deuxième ligne, il faut s'assurer que le délai de traitement initial a été suffisamment long (minimum 6 mois) pour être efficace, s'assurer qu'il ne s'agit pas d'une intolérance à l'une des composantes du traitement de 1ère ligne et s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un problème d'observance.

IV.4. Les résistances du VIH aux antirétroviraux.

Les erreurs de la TI, les recombinaisons génétiques ainsi que la pression de sélection due aux médicaments contribuent à l'émergence de nouveaux variants viraux. Ainsi, il en résulte un mélange de populations virales en équilibre instable et génétiquement différent, à partir duquel vont émerger les variantes antigéniques et les mutants résistants aux antirétroviraux. La résistance du VIH aux ARV correspond à une diminution de la capacité des ARV à freiner la réplication du virus, ce qui conduit à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes cibles des ARVs. Cette sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques, de la puissance du traitement antiviral et de la « barrière génétique » du virus vis-à-vis des différents antirétroviraux (nombre de mutations virales requises pour que le virus devienne résistant) mais aussi du taux important d'erreurs de la transcriptase inverse lors de la réplication du VIH (Götte, 2012).

La résistance primaire est observée chez les patients naïfs d'ARV qui ont été contaminées par des souches de VIH déjà résistantes aux ARVs (résistance transmise).

La résistance secondaire quant à elle est retrouvée chez des patients sous thérapie antirétrovirale (résistance acquise), lorsque le traitement est insuffisant pour entraîner une suppression de la réplication virale.

Certaines souches de VIH sont **naturellement résistantes** à certaines classes d'ARVs, c'est le cas du VIH-2 et du groupe O du VIH-1 qui sont résistants à la classe des INNTI.

Tous les ARV n'exposent pas au même risque de résistance du VIH. Pour certains ARV, une seule modification génétique du VIH va suffire à provoquer la résistance virale alors que, pour d'autres, plusieurs modifications seront nécessaires pour qu'elle apparaisse. Les mécanismes de résistance qui interviennent sont différents selon les classes ou selon les ARVs pour une même classe.

IV.4.1. Résistances du VIH aux INTI

Deux mécanismes différents sont impliqués dans la résistance aux INTI.

- **Mécanisme d'excision de l'INTI déjà incorporé** est favorisé le plus souvent par des mutations du VIH appelés TAM (*Thymidine Analog Mutations*) qui sont sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, AZT et d4T. Ces mutations favorisent l'excision par l'ATP de la molécule d'INTI monophosphate qui bloque la chaîne d'ADN viral en cours de synthèse (Menéndez-Arias, 2013). L'ATP attaque la dernière liaison phosphodiester entre l'avant-dernier nucléotide et l'INTI-monophosphate pour donner un dinucléotide non incorporable, lequel ne peut plus être en compétition avec son homologue naturel. La figure 20 regroupe les mutations sur le gène de la TI associées à la résistance aux INTIs et INNTI.

Les TAMs entraînent une efficacité d'excision variable selon les INTIs, plus efficace avec l'AZT et de façon décroissante sur d4T, ddC, ABC, 3TC, ddI et TDF (Naeger *et al.*, 2002), d'où la résistance croisée en présence de TAM. Les TAMs sont sélectionnées selon deux profils par les INTIs. Le profil TAM-1, composé des mutations M41L, L210W et T215Y, est beaucoup plus fréquent que le profil TAM-2 avec les mutations D67N, K70R et K219E/Q et T215F. Il a été décrit que le profil TAM-1 entraîne une résistance croisée *in vivo* entre ABC et TDF (Brun-Vézinet *et al.*, 2003; Masquelier *et al.*, 2004).

- **Mécanisme de diminution de l'incorporation** du désoxynucléoside triphosphate (dNTP) naturel dans le site actif de la transcriptase inverse (TI), aux dépens de l'analogue nucléosidique, est favorisé le plus souvent par les mutations K65R, L74V, Q151M et M184V (Menéndez-Arias, 2013). Ces dernières modifient soit l'affinité de la RT pour certains INTI ou diminuent l'incorporation de ces derniers dans l'ADN viral en cours de synthèse.

La mutation M184V entraîne un haut niveau de résistance à la lamivudine (3TC). Elle induit un mauvais positionnement de la 3TC-TP dans le site catalytique de l'enzyme (Sarafianos *et al.*, 1999) se traduisant par une diminution de l'affinité pour l'inhibiteur (Feng et Anderson, 1999) et une perte d'incorporation. La mutation M184V apparaît rapidement en cas d'échec virologique au 3TC en passant par une mutation intermédiaire M184I (Boucher *et al.*, 1993) et induit aussi une résistance croisée à d'autres INTIs (Johnson *et al.*, 2013).

La mutation K65R est une mutation décrite avec ddC, ddI et 3TC (Zhang *et al.*, 1994). Elle peut être sélectionnée seule ou en association avec la M184V par des régimes comportant le ténofovir et/ou l'abacavir (Harrigan *et al.*, 2000) et entraîne aussi une résistance au TDF et l'ABC (Parikh

et al., 2007). Toutefois, cette mutation induit une diminution de l'excision, entraînant donc une augmentation de la sensibilité des virus résistants aux molécules qui sélectionnent les mutations TAM via le mécanisme d'excision. Par conséquent, elle est rarement retrouvée en association avec les TAM (Valer *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2007). Ainsi, l'antagonisme entre K65R et TAM peut aussi expliquer l'absence de K65R si les TAM sont déjà présentes dans un régime avec ténofovir et pourrait mener à l'hypothèse selon laquelle l'administration de l'AZT avec le ténofovir permettrait de prévenir la sélection de la mutation K65R (Masquelier *et al.*, 2004).

La résistance aux INTI fait aussi intervenir un mécanisme mixte induit par des insertions au codon 69 de la transcriptase inverse (Boyer *et al.*, 2002). Ces insertions favorisent pour l'essentiel une excision accrue, mais aussi diminuent l'incorporation de certains INTI.

Le complexe mutationnel Q151M est composé d'un groupe de mutations dont A62V, V75I, F77L et F116Y dans lequel la Q151 apparaît en premier. Ces mutations sont sélectionnées en cas d'échec aux INTI, préférentiellement le d4T et le ddI. Associé à une multi-résistance à la plupart des INTIs, il a été montré que le complexe Q151M entraîne un haut niveau de résistance à l'AZT, ddI, ddC, d4T et l'ABC (Iversen *et al.*, 1996).

IV.4.2. Résistances du VIH aux INNTI

Cette classe comporte des ARVs ayant une barrière génétique très faible. Un changement d'acides aminés de la poche hydrophobe peut entraîner une modification de la conformation, entraînant une diminution de l'affinité de l'INNTI. Bien que la plupart des changements affectent directement l'affinité pour l'inhibiteur, quelques-uns agissent indirectement en changeant la position ou l'orientation des acides aminés impliqués directement dans le contact avec l'inhibiteur. Les mutations comme la Y181C et Y188L/C participent directement à la formation de la poche. Aussi, d'autres mutations comme la K101E et E138K participeraient à la formation de la poche hydrophobe (Ren *et al.*, 2006; 2007). Par ailleurs, d'autres mutations participent à la fixation des INNTIs à la TI de façon directe comme les positions 100 et 106 ou indirectement avec les positions 108 et 103 (Chan *et al.*, 2001; Ren et Stammers, 2008). Les mutations H221Y, P225H, M230L et P236L sont moins fréquemment observées.

Certaines mutations entraînent une résistance croisée aux INNTIs mais à des degrés différents selon les molécules. En effet, la mutation Y181C entraîne une forte résistance à la nevirapine (Das *et al.*, 2006) et une réduction de la sensibilité à l'éfavirenz (Ren et Stammers, 2008). La figure 16 montre les mutations associées à la résistance au niveau de la TI.

D'autre part, il a été démontré qu'*in vitro* et *in vivo*, des mutations situées au niveau du domaine de connexion de la RT (entre les domaines de la polymérase et de la RNase-H) isolées ou en

IV.4.3. Résistances du VIH aux IP

Cette résistance opère par une diminution importante de la capacité catalytique de la protéase, et une diminution de l'affinité de la liaison entre l'enzyme et l'IP (Menéndez-Arias, 2013). C'est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations situées soit au niveau du site actif de cette enzyme, ou à distance. On distingue les mutations primaires ou majeures (D30N, M46I/L, I50L/V, V82A/F/S/T, I84V, L90M) très souvent situées au niveau du site actif de l'enzyme et sélectionnées en premier lors d'un échappement viral. Elles sont plus ou moins spécifiques de l'IP et ont un effet important sur la diminution de sensibilité du virus à l'antirétroviral concerné. Les mutations secondaires ou mineures ont peu d'effet sur le niveau de résistance déjà atteint et modifient indirectement la conformation générale du site actif pour renforcer la résistance (L10F/I/R/V, K20M/R, L24I/V, L33F, M36I, I47V, G48V, F53L, I54L/M/V, L63P, A71T/V, G73S, N88D/S).

IV.4.4. Résistances du VIH aux inhibiteurs d'entrée

Les résistances aux inhibiteurs de l'entrée du VIH font intervenir des mécanismes différents de ceux des autres classes d'antirétroviraux. Certains déterminants de cette résistance aux inhibiteurs d'entrée ont été caractérisés tandis que d'autres demeurent toujours non explicités.

La résistance à l'inhibiteur de fusion Fuzeon est liée à une sélection de mutations sur divers acides aminés, situés sur les positions 36 à 45 de la région HR1 de la gp41 du VIH (Sista *et al.*, 2004). Ces mutations qui sont sélectionnées en quelques semaines de réplication virale sous T-20 disparaissent dès l'arrêt de ce dernier (Lu *et al.*, 2006; Deeks *et al.*, 2007). Des polymorphismes naturels ont été décrits dans la région HR2 de la gp41 (Xu *et al.*, 2005). Ces mutations auraient un effet faible sur la susceptibilité à l'enfuvirtide, de manière isolée ou en combinaison avec les mutations dans HR1, elle sont probablement des mutations compensatrices des mutations de la région HR1 pour la capacité répliquative (Marcelin et Calvez, 2007). Les mutations impliquées dans cette résistance sont: G36DS, I37V, V38, AME, Q39R, Q40H/K/P/T, N42D/T, N43D/K/S, N42T+N43S, L44M et L45M (Johnson *et al.*, 2013).

La résistance du VIH aux ARVs antagonistes du co-récepteur CCR5 comme maraviroc (MVC) et vicriviroc (VVC) peut se développer à la fois *in vitro* et *in vivo* (Kuhmann *et al.*, 2004; Ogert *et al.*, 2010). Dans la voie génétique la plus commune à cette résistance, des changements multiples de la séquence V3 rendent le virus plus dépendant de l'extrémité N-terminale de CCR5 malgré la présence de l'inhibiteur. En effet, des études ont montré que le virus résistant pouvait soit reconnaître à la fois le corécepteur CCR5 et les complexes inhibiteur-CCR5, soit pouvait interagir avec le CCR5 malgré le changement de conformation par la présence de l'ARV (Baba *et al.*,

2007; Berro *et al.*, 2009). Une voie beaucoup plus rare implique des changements dans le peptide de fusion de la protéine gp41 (Anastassopoulou *et al.*, 2009).

IV.4.5. Résistances du VIH aux Inhibiteurs d'intégrase (IN)

Les mutations qui engendrent une résistance aux inhibiteurs d'intégrase sont presque toujours localisées au niveau du site actif de l'intégrase (Hazuda *et al.*, 2004; Hare *et al.*, 2010). Ainsi, ces mutations ont des effets délétères sur la fonction enzymatique et par conséquent sur la capacité répliquative virale (Fransen *et al.*, 2009; Delelis *et al.*, 2010). Dans des études cliniques, la résistance au Raltégravir est associée à trois voies indépendantes ou à des ensembles de mutations dans le gène de l'intégrase définissant des mutations primaires comme Y143, N155, ou Q148 (Fransen *et al.*, 2009). Ces dernières sont généralement associées avec certaines mutations secondaires. La N155 (H) est souvent associée à E92Q, V151L, T97A, G163R, et L74M, tandis que pour Q148 (K/R/H), G140S/A et E138K sont courantes (Lataillade *et al.*, 2007; Low *et al.*, 2009). Une importante résistance croisée est observée entre les inhibiteurs d'intégrase presque indépendamment des mutations primaires/secondaires (Goethals *et al.*, 2008; Marinello *et al.*, 2008).

Les résistances du VIH constituent une menace importante contre les avancées obtenues en matière de traitement ARV. Aujourd'hui, des méthodes virologiques performantes ont été développées pour déterminer la résistance des souches virales aux molécules antirétrovirales.

IV.5. Méthodes d'étude de la résistance

IV.5.1. Test phénotypique de résistance

Ces tests utilisent des cultures virales exposées à des concentrations croissantes d'ARV pour déterminer les concentrations inhibitrices 50% et 90% (CI50 et CI90) capables d'inhiber respectivement 50 et de 90% de la réplication virale. La résistance d'un virus se définit comme la capacité à se multiplier en présence d'ARV à une concentration qui inhibe la réplication d'un virus sensible. Ce phénomène se traduit par une augmentation de la CI50 ou de la CI90. La technique la plus utilisée actuellement repose sur la production de virus recombinant à partir de l'ARN viral plasmatique des patients: la zone cible est amplifiée puis insérée dans un virus non infectieux dont la région codante correspondante a été supprimée, conduisant à une recombinaison homologue. Les mesures de CI50 et CI90 s'effectuent ensuite en cultivant le virus recombinant en présence de plusieurs concentrations d'ARV (Wagner et Frenkel, 2006).

Les tests phénotypiques disponibles actuellement commercialisés sont: Antivirogram® (Virco, Mechelem, Phenoscript® (Viralliance) et PhenoSense® (Monogram, Biosciences).

L'interprétation des tests phénotypiques utilise une valeur seuil biologique déterminée à partir des virus des patients naïfs de tout traitement antirétroviral, et basée sur la variation naturelle de la₇₁

sensibilité phénotypique des médicaments. Elle utilise aussi une valeur seuil clinique déterminée à partir des virus des patients sous traitement antirétroviral et basée sur la variation de la sensibilité phénotypique des médicaments avant et après la perte de la réponse virologique. En plus de leur complexité, les limites de ces tests sont surtout liées à l'établissement et la validation des valeurs seuil (Youree et D'Aquila, 2002).

IV.5.2. Test génotypique de résistance

- Le test génotypique est basé sur l'analyse des séquences nucléotidiques et permet de mettre en évidence des mutations de résistance au niveau des gènes cibles des antirétroviraux. Aujourd'hui appelée séquençage conventionnel, **la méthode de Sanger** est la plus utilisée (voir chapitre III). Une fois les séquences isolées sur un séquenceur automatique, les positions de mutation sont identifiées par rapport aux séquences de références du VIH. A côté des kits Trugene® HIV-1 Genotyping Kit (Siemens) et ViroSeq Genotyping System(Abbott) qui donnent de bons résultats, des techniques maison dont celle du groupe AC11 de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance>) qui sont aujourd'hui utilisées par beaucoup de laboratoires

Par contre, la limite majeure de cette technique est son incapacité à détecter les séquences des variants minoritaires <10-20% de la population totale dans le cas du VIH (Halvas *et al.*, 2006). Ces populations minoritaires sont souvent responsable d'échec virologique pour un nouveau traitement et leur détection précoce permet de changer plus rapidement de traitement (Halvas *et al.*, 2010).

- Isolement des variants minoritaires

D'autres méthodes d'étude des résistances ont été mises au point et permettent d'isoler à la fois les variants majoritaires et minoritaires chez une personne infectée. Parmi ces différentes méthodes nous pouvons citer le **pyroséquençage** utilisée par le «*deep sequencing*», la *SGA* (voir chapitre II) et la **PCR allélique** entre autres. Cette dernière, basée sur l'utilisation d'amorce spécifique à une mutation, est une autre méthode pour détecter les mutations de résistances. Dans cette technique, les amorces sont choisies en fonction des mutations. Elles sont donc spécifiques de la zone de mutation contrairement à la PCR normale où les amorces sont choisies en fonction des régions constantes du génome. Elle est actuellement utilisée dans la recherche de mutations spécifiques au sein de la population minoritaire inaccessible par la méthode de séquençage (Wainberg *et al.*, 2011).

La complexité des profils de mutations de résistance a conduit à l'élaboration d'algorithmes permettant leur interprétation par corrélation des informations de test de sensibilité aux médicaments *in vitro* pour chaque molécule (phénotype), de tests génotypiques et de l'histoire thérapeutique des patients (Chan et Kantor, 2009).

III.5.3. Interprétation des tests génotypiques de résistance

Plusieurs algorithmes ont vu le jour dont les plus grands sont IAS-USA, HIVdb drug resistance interpretation algorithm, ANRS drug resistance interpretation algorithm et Rega Institute drug resistance interpretation algorithm. Les résultats sont généralement rapportés comme étant sensibles, intermédiaires ou résistants. Toutefois, l'interprétation des résultats peut varier selon les algorithmes principalement construits sur des résultats provenant de sous-type B. Ainsi, les discordances sont beaucoup plus marquées quand ils sont appliqués aux sous-types non-B (Yebra *et al.*, 2010; Depatureaux *et al.*, 2011).

L'OMS en utilisant ces plus grands algorithmes a mise en place une définition des mutations de résistance en se basant sur quatre critères essentiels (Shafer *et al.*, 2007): la mutation doit être associée à la résistance, elle ne doit pas être polymorphique, elle doit être sous-type indépendant et doit être observée sous pression médicamenteuse. Toutefois, plusieurs études ont montré que les mutations pouvaient être sous-type dépendant. Ce qui fait que dans cette définition, le troisième critère pose un problème.

Chapitre V. L'infection à VIH au Sénégal

V.1. Présentation du Pays

Sur le plan géographique : situé à l'extrême ouest du continent africain, avec sa pointe qui est la plus occidentale de toute l'Afrique, le Sénégal couvre une superficie de 196712 Km². Il s'ouvre à l'Ouest sur l'Océan Atlantique avec 700 Km de côtes. Le Sénégal est limité au nord par la République Islamique de Mauritanie, à l'Est par le Mali et au sud par la République de Guinée et la Guinée-Bissau (figure 17).



Figure 17. Carte du Sénégal montrant les 14 régions (www.unaids.org)

Sur le plan administratif : le territoire compte aujourd'hui 14 régions administratives et la région de Dakar qui est la capitale économique et administrative est une presque île située à l'extrême Ouest du pays et compte à elle seule 43 communes d'arrondissement.

Sur le plan démographique, la population était estimée à 13 567 338 habitants en 2013 (<http://www.statistiques-mondiales.com/senegal.html>) (consulté en octobre 2013), avec une densité inégalement répartie dans les 14 régions. La région de Dakar, capitalisée à elle seule près de 5000 habitants au km².

Comparé aux autres pays du continent africain, le Sénégal est très pauvre en ressources naturelles. Ses principales recettes proviennent de la pêche et du tourisme. Cependant, compte-tenu de sa situation géographique et de sa stabilité politique, le Sénégal fait partie des pays africains les plus industrialisés.

V.2. Aperçu de l'infection à VIH au Sénégal

Au Sénégal, le système de surveillance par sites sentinelles (qui permet de suivre la manière dont l'épidémie évolue au sein de différents groupes de population avec une priorité sur les populations les plus à risques) mis en place depuis 1989, couvre aujourd'hui toutes les quatorze régions du pays aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine. La cinquième Enquête Démographique et de Santé à Indicateurs Multiples au Sénégal (EDSV-MICS) a été exécutée d'octobre 2010 à avril 2011 (www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR258/FR258.pdf). Les résultats de cette dernière confirment le caractère concentré de l'épidémie du VIH au Sénégal: prévalence faible dans la population générale et élevées dans les groupes à risque.

V.2.1. Prévalences du VIH dans la population générale

Depuis la découverte des premiers cas en 1986 au Sénégal, le nombre de personnes infectées par le VIH s'exprime aujourd'hui en termes de milliers. Selon le rapport final de l'EDSV-MICS, la prévalence de VIH au Sénégal est restée stable avec 0,7% des adultes âgés de 15-49 ans qui sont séropositifs, infectés soit par le VIH-1 (0,5%) ou le VIH-2 (0,2%). Le taux de séroprévalence chez les femmes de 15-49 ans est estimé à 0,8% (0,6% de VIH-1 et 0,3% de VIH-2) et à 0,5% chez les hommes du même groupe d'âges (0,4% de VIH-1 et 0,1% de VIH-2). L'analyse de la prévalence du VIH entre les régions met en évidence de nettes disparités. Le Tableau IV ci-dessous montre les prévalences du VIH dans la population générale pour les 14 régions et selon certains facteurs socio-économiques.

Globalement, la prévalence est équivalente en milieu urbain et en milieu rural (0,7%) et est moins élevée pour ceux qui n'ont pas eu à travailler durant les 12 derniers mois avant l'EDS-MICS 2010-11. Les disparités régionales sont notables avec des taux en dessous de 1% pour certaines régions dont Dakar (0,4%); Saint Louis (0,9%); Thiès (0,3%). Pour d'autres régions, la prévalence est supérieure ou égale à 1% (tableau IV). C'est le cas des régions du sud comme Ziguinchor (1,0%); Kédougou (1,7%) et Sédhiou (1,1%). C'est dans la région de Kolda que le taux le plus élevé est observé (2,4%). Les femmes des régions de Sédhiou (2,0%), Kédougou (2,5%) et de Kolda (2,4%) ont des séroprévalences nettement plus élevées que celles des autres régions (CNLS-Sénégal, 2012).

Tableau IV. Prévalences régionales du VIH au Sénégal

Pourcentage de séropositifs parmi les 15-49 ans testés.

(Rapport EDS-MICS 2010-11, www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR258/FR258.pdf)

Caractéristique socio-économique	Femme		Homme		Ensemble	
	Pourcentage VIH positif	Effectif	Pourcentage VIH positif	Effectif	Pourcentage VIH positif	Effectif
Emploi (durant les 12 derniers mois)						
N'a pas travaillé	0,7	2 855	0,1	576	0,6	3 430
A travaillé	0,9	2 472	0,5	3 528	0,7	6 000
Milieu de résidence						
Urbain	0,9	2 608	0,3	2 297	0,7	4 905
Rural	0,7	2 718	0,6	1 807	0,7	4 525
Région						
Dakar	0,4	1 379	0,5	1 285	0,4	2 664
Ziguinchor	1,1	197	0,9	195	1,0	392
Diourbel	0,2	632	0,0	327	0,2	960
Saint-Louis	1,2	318	0,5	249	0,9	567
Tambacounda	1,6	251	1,2	199	1,4	449
Kaolack	1,5	415	0,6	292	1,1	707
Thiès	0,6	711	0,0	525	0,3	1 236
Louga	0,2	381	0,0	244	0,1	625
Fatick	1,8	246	0,0	191	1,0	436
Kolda	2,4	217	2,4	184	2,4	401
Matam	0,5	204	0,1	141	0,3	345
Kaffrine	0,5	193	0,5	130	0,5	323
Kédougou	2,5	44	0,7	31	1,7	75
Sédhiou	2,0	140	0,0	112	1,1	252

V.2.2. Le VIH-2 au Sénégal

Le VIH-2 a été décrit pour la première fois en 1985 chez des travailleuses de sexe à Dakar. Il a été décrit avec une prévalence initiale de 8% (Barin *et al.*, 1985). Elle est ensuite passée de 8% à 11% entre 1985 et 1995 puis à 5,5% en 2003 (Hamel *et al.*, 2007). D'après les résultats de la dernière EDS-MICS 2010-2011, la prévalence globale du VIH-2 est de 0,3% contre 0,7% pour le VIH-1. De la même façon que le VIH-1, sa prévalence est beaucoup plus élevée chez les femmes (0,3% contre 0,1% chez les hommes). D'après les données obtenues de la dernière surveillance sentinelle de 2010 (non publiée), les prévalences de VIH-2 retrouvées dans certains sites suivent un gradient sud-nord, avec des niveaux beaucoup plus importants dans les régions limitrophes de la Guinée.

V.2.3. Prévalences du VIH dans les populations clés

- Depuis 2006, des **groupes passerelles** ont été identifiés. Ces derniers sont constitués de populations qui, à cause de leur situation professionnelle ou sociale, résident pendant un certain temps en dehors de leur domicile, ce qui les expose à des pratiques à risque de contracter le VIH. Ces groupes une fois infectés peuvent, au retour dans leur famille, transmettre le VIH à leurs partenaires réguliers officiels. Ainsi, une surveillance combinée visant à établir les liens entre le statut sérologique et les comportements chez les groupes passerelles a permis de mettre en évidence des

prévalences plus ou moins différentes de celle de la population générale. En effet, selon le rapport du Conseil National de Lutte contre le SIDA du Sénégal (CNLS), la prévalence est de 0,2% chez les policiers, 0,6% chez les camionneurs, 0,8% chez les pêcheurs, 1,3% chez les orpailleurs et 1,5% chez les détenus (CNLS-Sénégal, 2012). Cependant, il existe de grandes différences de prévalence dans les groupes ayant plus de risques d'infection à VIH et des IST, notamment les professionnelles du sexe, les HSHs et les usagers de drogues injectables.

Chez les femmes professionnelles du sexe (PS), la prévalence est estimée à 19,8% (ENSC, 2006) et elle est restée stable dans ce groupe en 2010 avec estimation à 18,5% (ENSC, 2010) (CNLS-Sénégal, 2012).

Chez les usagers de drogues, une enquête de prévalence réalisée entre avril et juillet 2011 au sein de ce groupe a permis d'estimer la prévalence du VIH à 4,4% chez l'ensemble des usagers de drogues, soit 7 fois plus que dans la population générale. Elle est estimée à 13% chez les femmes et 3% chez les hommes. Ces prévalences peuvent varier selon le mode d'usage de drogue atteignant 9,4% chez les injecteurs (CNLS-Sénégal, 2012).

Chez les HSHs, une description depuis 1956 avait déjà fait état de leur existence au Sénégal (Crowder, 1956) ; des données quantitatives anthropologiques sur les besoins, les comportements, les connaissances et attitudes ont été recueillis en 2000 (Niang *et al.*, 2003), montrant une forte vulnérabilité au VIH et aux IST. Dans le pays, l'homosexualité est pénalement réprimée en tant qu'attentat aux mœurs. Elle est punie, aux termes de l'article 319 du code pénal sénégalais¹, alinéa 3, issu de la loi no 66-16 du 12 février 1966. La première étude épidémiologique réalisée qu'en 2004 avait montré une prévalence du VIH de 21,5%, soit 30 fois plus élevée que dans la population générale au Sénégal (Wade *et al.*, 2005). En 2007, une deuxième enquête visant à mesurer les tendances de la prévalence du VIH et des IST et à évaluer l'impact des campagnes de prévention dans le pays a été menée. Les résultats de cette enquête montrent que la prévalence globale de 21,8% retrouvée est restée stable entre 2004 et 2007. Elle est estimée à 12,7% chez les moins de 25 ans contre 34,4% chez les HSHs d'âge \geq à 25 ans (Larmarange *et al.*, 2010; Wade *et al.*, 2010).

V.3. Prise en charge des personnes vivant avec le VIH au Sénégal

V.3.1. Décentralisation de la prise en charge et augmentation de la mise sous ARV

Avec l'annonce du succès des traitements ARV, en 1996, le gouvernement Sénégalais s'est engagé à mettre en place l'initiative Sénégalaise d'Accès aux ARVs (ISAARV) en 1998, en initiant une phase pilote limitée au niveau de 3 sites à Dakar. Les résultats, ayant prouvé la faisabilité des

traitements ARVs, ont conduit en 2001 à l'extension de l'ISAARV au niveau d'autres sites de Dakar et dans les régions. L'inscription des ARV sur la liste des médicaments essentiels et leur gratuité à partir de 2003 ont été déterminantes dans la décentralisation de la prise en charge dans l'ensemble des 14 régions. Depuis le début de la décentralisation, une augmentation progressive des sites de prise en charge (PEC) pédiatriques et des patients adultes est notée. Le nombre des sites de prise en charge est passé de 3 sites pédiatriques et 8 sites adultes à l'origine à 82 et 114 sites respectivement en 2011 (CNLS-Sénégal, 2012). La figure 18 illustre l'évolution du nombre de sites de prise en charge entre 2002 et 2011.

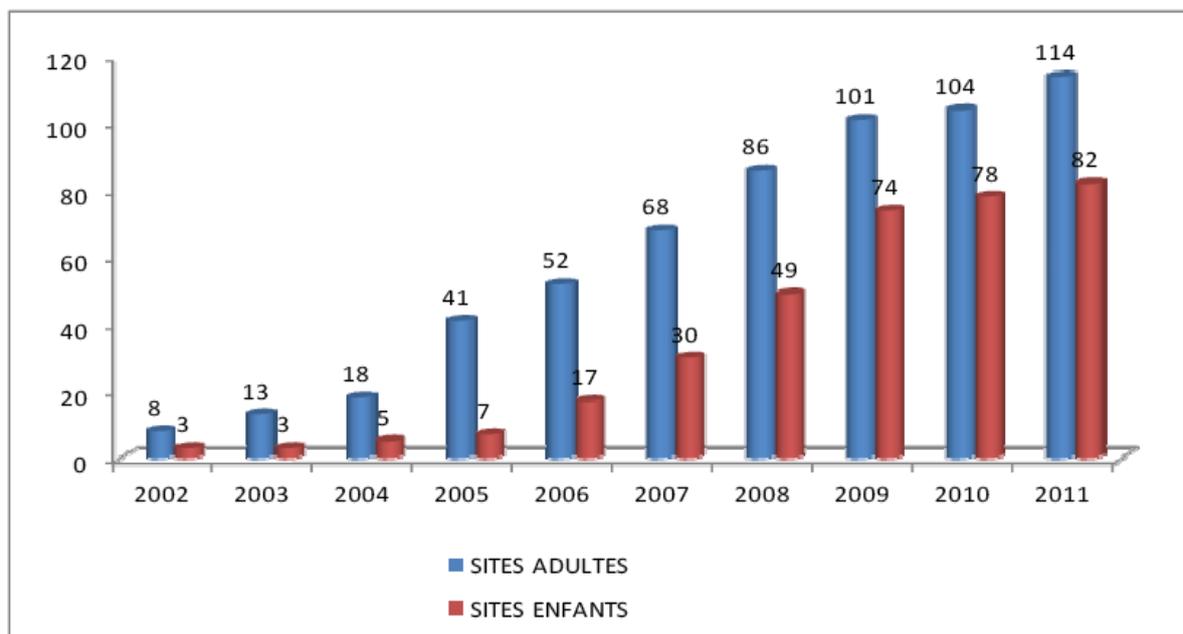


Figure 18. Evolution du nombre de sites de prise en charge de 2002 à 2011 au Sénégal (CNLS-Sénégal, 2012).

Nous avons ainsi assisté à une augmentation du nombre de PVVIH sous traitement ARV qui est passé de 1855 patients en 2004 à 18352 patients en 2011. Le nombre des patients nouvellement mis sous traitement ARV a augmenté progressivement au niveau de tous les sites de Dakar et des régions. Parmi les 4226 qui auraient besoin de traitement en 2011, 3320 ont eu à bénéficier du TARV soit une couverture nationale de 78% pour 2011.

Tous les patients sous ARV bénéficient d'un suivi clinique assuré par les centres de prise en charge. Les premières lignes de traitement du VIH-1 associent 2 INTIs + 1 INNTI. Les secondes lignes pour le VIH-1 ainsi que les premières lignes pour le VIH-2 ou la co-infection VIH-1+VIH-2 associent 2 INTIs + 1 IP. Les premières actuellement retrouvées sont résumées dans la figure 19 ci-dessous.

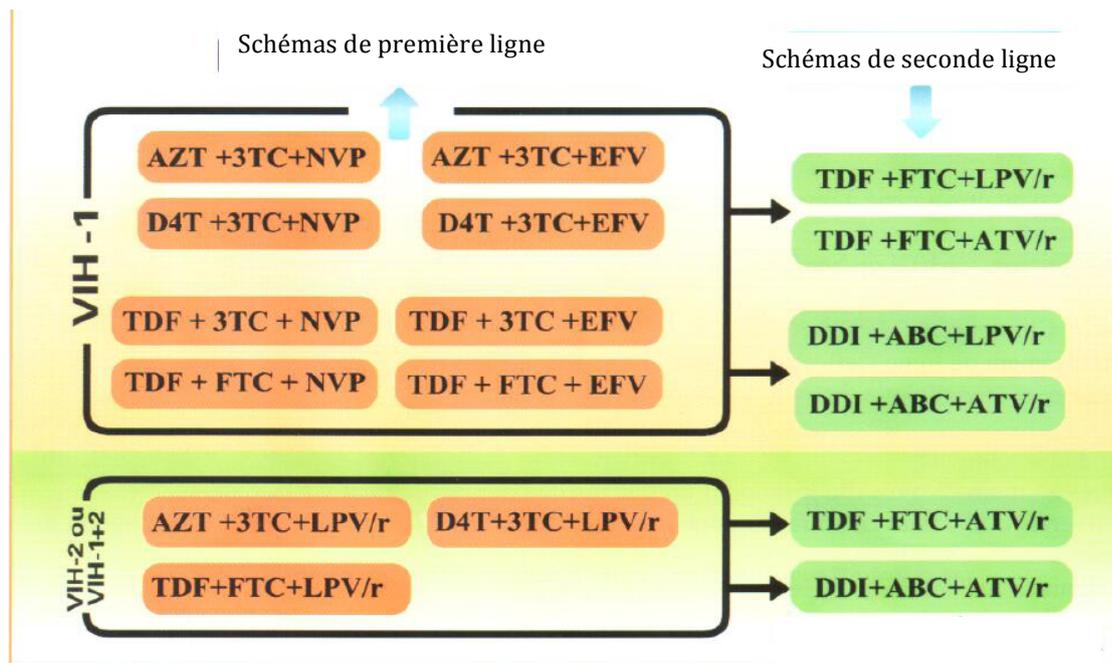


Figure 19. Protocoles de première et seconde ligne de traitement ARV chez l'adulte et l'adolescent au Sénégal (Division SIDA/IST, 2009).

Ainsi, les premières lignes de traitement proposées comprennent la Combivir associée à EFV ou la NVP ou la d4T associée à l'EFV ou NVP chez les patients anémiés. Toutefois, le d4T est à changer au bout de 6 mois après la correction de l'Anémie. Aussi, il existe un deuxième choix de première ligne utilisant le TDF associé soit à la 3TC ou FTC et avec l'EFV ou NVP. Pour ce qui est des patients infectés par le VIH-2 ou co-infectés VIH-1+VIH-2, les INNTIs (EFV ou NVP) sont remplacés par le Kalétra (LPV/r).

En deuxième ligne, nous retrouvons en plus des IP boostés (LPV/r et ATV/r), le remplacement de la combivir ou du d4T par le TDF associé à la FTC, et celle du TDF par le DDI associé à ABC. Ces traitements sont distribués de façon gratuite tous les 2 à 3 mois.

V.3.2. Le suivi immuno-virologique

Toutes les régions disposent d'appareils de comptage des lymphocytes CD4 (Automates et MIF) pour assurer le suivi immunologique des patients. Cependant, tous les sites de prise en charge ne disposent pas de ce matériel. Il s'y ajoute le fait que les sites sont aussi confrontés à des problèmes d'absence de moyens pour la maintenance des équipements de laboratoire et des ruptures fréquentes des réactifs pour le comptage des CD4. Comparé à la quantification de la charge virale, l'approvisionnement et la maintenance en réactifs de CD4 sont beaucoup plus réguliers. De plus comme il y'a différentes plateformes de détermination de TCD4, dans différents sites d'une région, les patients arrivent à disposer du suivi immunologique en temps réel.

L'introduction de la prise en charge virologique du VIH a constitué une stratégie novatrice au Sénégal et dans d'autres pays en développement. La gratuité pour les examens du suivi virologique comme la charge virale (CV) plasmatique a été proposée en décembre 2003 par le Gouvernement du Sénégal. Depuis, à travers des activités de routine, chaque PVVIH bénéficie de la quantification de la charge virale tous les 6 mois après la mise sous ARV. Toutefois, avec l'insuffisance en moyens, ce suivi virologique n'est disponible qu'au niveau de Dakar. Par conséquent, même si le laboratoire de référence national (LBV) dispose de plusieurs plateformes de mesure de la charge virale, les conditions de collecte et de transport des échantillons de sang posent souvent des difficultés dans le suivi virologique. De plus, cette disparité de l'offre des soins au niveau national, conduit le laboratoire de référence à évaluer le prélèvement sur papier buvard (DBS) comme outil alternatif de support de prélèvement surtout en milieu décentralisé. En dehors des enquêtes de surveillance sentinelle, il est aujourd'hui utilisé dans tout le pays dans le cadre du diagnostic néonatal pour la PTME, la charge virale et le génotypage des PVVIH dans la banlieue dakaroise et dans les régions.

Travaux de thèse

I. Contexte et objectif de la thèse

Grace à l'utilisation du traitement antirétroviral, le pronostic de l'infection à VIH s'est considérablement amélioré, malgré l'absence d'un vaccin préventif et d'un traitement éradiquant totalement le virus chez une personne infectée. La mise en place des traitements ARV dans les pays à ressources limitées a nécessité une approche différente de celle en cours dans les pays industrialisés, car le suivi virologique, intensif et coûteux, n'est pas possible pour la grande majorité des patients traités. En outre, des lacunes dans les systèmes de santé et des ressources, comme les systèmes d'approvisionnement et le manque de personnel qualifié pour prescrire et surveiller les patients sous ARV, peuvent également accélérer le développement de résistance du virus aux antirétroviraux (ARV).

De ce fait, la plupart de ces pays utilisent l'approche de santé publique proposée par l'OMS. Cette approche propose un traitement de première ligne standard comprenant 2 inhibiteurs nucléosidiques de la RT (NRTI) et un inhibiteur non nucléosidique de la RT (NNRTI). Afin de limiter l'émergence des virus résistants dans les pays industrialisés, le traitement ARV est systématiquement associé à un suivi virologique, comprenant la mesure de la charge virale et le génotypage des virus des patients en échec virologique. Cependant, le traitement ARV étant à vie, ce passage à l'échelle sans suivi virologique structuré pourrait avoir pour conséquence une émergence rapide des souches de VIH-1 résistantes. La transmission de ces dernières peut poser des problèmes dans la prise en charge tant au plan clinique, que programmatique par une non réponse à la première ligne thérapeutique due aux mutations (Shafer et Schapiro, 2005; Tozzi *et al.*, 2005).

Un autre défi auquel le traitement ARV et surtout l'accès universel dans les pays à ressources limitées doivent faire face est la capacité du virus à échapper très rapidement aux pressions immunitaires ou pharmacologiques, par la sélection de variants génétiquement distincts pouvant contrecarrer ces pressions. La présence de variants caractérisant la grande diversité génétique du VIH a des conséquences importantes comme décrit en III.5. Dans les zones où circulent plusieurs souches de VIH, des phénomènes de doubles infections sont courants et sont à l'origine du nombre important de virus recombinants. Ces doubles infections sont les plus retrouvées chez les populations à risque de multipartenariat comme les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSHs). Ces derniers sont depuis le début de l'épidémie touchés de manière disproportionnée par le VIH comparés aux populations générales à travers tous les pays.

Au Sénégal, la gratuité des ARVs et la décentralisation ont permis d'accroître le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) sous traitement antirétroviral. En fin 2011, le conseil national de lutte contre le SIDA (CNLS) estime à 18352 le nombre de sénégalais vivant avec le VIH recevant un traitement antirétroviral avec 62% dans les régions et 38% dans la capitale. Malgré les efforts

réalisés dans l'accès aux soins, les personnes infectées par le VIH n'ont pas encore l'équité totale dans la prise en charge sur l'étendue du territoire. Par ailleurs, la prévalence de VIH est 27 fois plus élevée chez les HSHs que dans la population générale. Ainsi, après 10 ans de circulation d'ARV, et dans un contexte d'épidémie de type concentré, il était important d'évaluer l'efficacité du traitement ARV ainsi que l'impact de la diversité génétique, d'autant plus que dans ce pays circulent plusieurs sous-types et formes recombinantes du VIH.

Sur ces principes de base, nous avons pour ces travaux de thèse, décliné quatre objectifs de recherche:

- Objectif 1 (Chapitre 1): Documenter les résistances du VIH-1 aux ARV transmises chez des personnes naïves de traitement, ainsi que la diversité génétique des souches circulant chez elles.
- Objectif 2 (Chapitre 2): Evaluer les réponses virologiques, la fréquence des résistances du VIH-1 aux ARV à un et deux ans de traitement de première ligne selon les recommandations du programme national au Sénégal.
- Objectif 3 (Chapitre 3): Documenter la fréquence et les profils des infections multiples avec des sous-types ou CRFs différents du VIH-1/M chez les HSHs au Sénégal.
- Objectif 4 (Chapitre 4): Etudier l'origine géographique et temporelle du sous-type C du VIH-1 circulant dans le pays, notamment chez les HSHs.

II. Cadre de l'étude

Cette thèse a été réalisée entre l'unité de Biologie moléculaire du laboratoire Bactériologie-Virologie (LBV) du CHU Aristide Le Dantec (HALD) au Sénégal et l'Unité Mixte Internationale 233 (UMI 233) TransVIHMI de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université de Montpellier 1 (UM1) en France.

Le laboratoire de bactériologie-virologie est le laboratoire de référence national pour le VIH/SIDA et les ISTs. Il a pour vocation le diagnostic biologique, la recherche et la formation dans les domaines de la Bactériologie et de la Virologie. Il est aussi le siège du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA. Ce laboratoire sous la responsabilité du Professeur Souleymane Mboup, avait initié dès 1985 des activités de recherche sur les rétrovirus humains en partenariat avec le programme national de lutte contre le SIDA. Ainsi, en 1995, de nombreux travaux ont été menés avec le laboratoire de rétrovirus de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier,

l'UMR145 qui est devenu l'UMI233. Dans la dynamique, spécifiquement dans le domaine des Maladies infectieuses émergentes et tropicales, elle étudie les spécificités de l'infection à VIH dans les pays du Sud et notamment en Afrique en s'appuyant sur les acquis de la recherche au Nord. Elle est sous la direction du professeur Eric Delaporte et a pour implantations principales l'IRD de Montpellier.

Cette thèse s'est réalisée en collaboration avec plusieurs institutions au Sénégal, notamment la division SIDA et IST au Sénégal, le Centre de Traitement Ambulatoire (CTA), le Centre de Recherche Clinique et de formation (CRCF) du CHU de Fann, l'hôpital Roi Baudouin (RB) de la banlieue dakaraise, le Centre de Promotion de la Santé (CPS) ainsi que les services de médecine interne et de dermatologie au CHU HALD.

Chapitre I. Etude de la résistance transmise du VIH-1 aux antirétroviraux chez des patients naïfs de traitement au Sénégal

Ce travail a fait l'objet d'une publication et l'article correspondant est exposé ci-dessous dans sa version finale telle que publiée (page 90-94).

Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Leye N, Ngom-Gueye NF, Montavon C, Peeters M, Mboup S.

Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients from Senegal.

AIDS Res Hum Retroviruses; 26 (10):1133-8, (2010).

Résumé en français

I.1. Introduction

Grace au traitement antirétroviral (TAR), il y'a eu une amélioration de la qualité de vie des PVVIHs. Par ailleurs, il est désormais reconnu qu'il permet de diminuer les risques de transmission du VIH en réduisant la charge virale et par conséquent, le risque de transmission (Williams *et al.*, 2011). Cependant, le TAR étant à vie, le risque d'émergence de résistances aux ARV devient inévitable et de plus en plus élevé au cours du temps. La transmission de ces virus résistants aux personnes nouvellement infectées pourrait compromettre les possibilités thérapeutiques déjà limitées dans les pays en développement. Au Sénégal, grâce à l'initiative gouvernementale ISAARV (Initiative Sénégalaise pour l'Accès aux ARV), la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) est disponible depuis 1998 à Dakar. La gratuité de la prise en charge antirétrovirale depuis 2003 a permis d'accroître le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) sous TAR. Il deviendra alors, de plus en plus important de surveiller l'apparition de virus résistants pouvant être transmis aux personnes nouvellement infectées, afin d'identifier les schémas thérapeutiques optimaux.

Ainsi, l'objectif principal de ce premier chapitre de thèse est de documenter les niveaux de résistance transmise du VIH-1 qui pourrait compromettre l'efficacité des schémas thérapeutiques de première et de deuxième ligne.

I.2. Méthodologie

I.2.1. Sites et Populations d'étude

Les échantillons de sang analysés dans le cadre de ces études de résistance ont tous été obtenus au Sénégal. Un total de 200 échantillons de patients VIH-1 positifs, naïfs de traitement ARV, provenant principalement des sites du CTA, CRCF/MI et Roi Baudouin (figure 20) a été étudié. Parmi eux, 96 prélèvements de 1998 et 2001 ont été obtenus chez des patients choisis au hasard

parmi les J0 de l'ISAARV. Les 104 autres échantillons ont été obtenus entre 2003 et 2007 à partir d'autres patients naïfs d'ARVs, asymptomatiques et récemment infectés. Parmi ce deuxième groupe, 56 ont été échantillonnés entre 2003 et 2005 parmi des personnes ayant un taux de LTCD4 supérieur ou égal à $350/\text{mm}^3$. Les 48 restants ont été recrutés en 2007 à travers le projet ANRS 12134 sur la base du taux de LTCD4 supérieur ou égal à $500/\text{mm}^3$, ou de l'âge < 25 ans ou des deux critères.

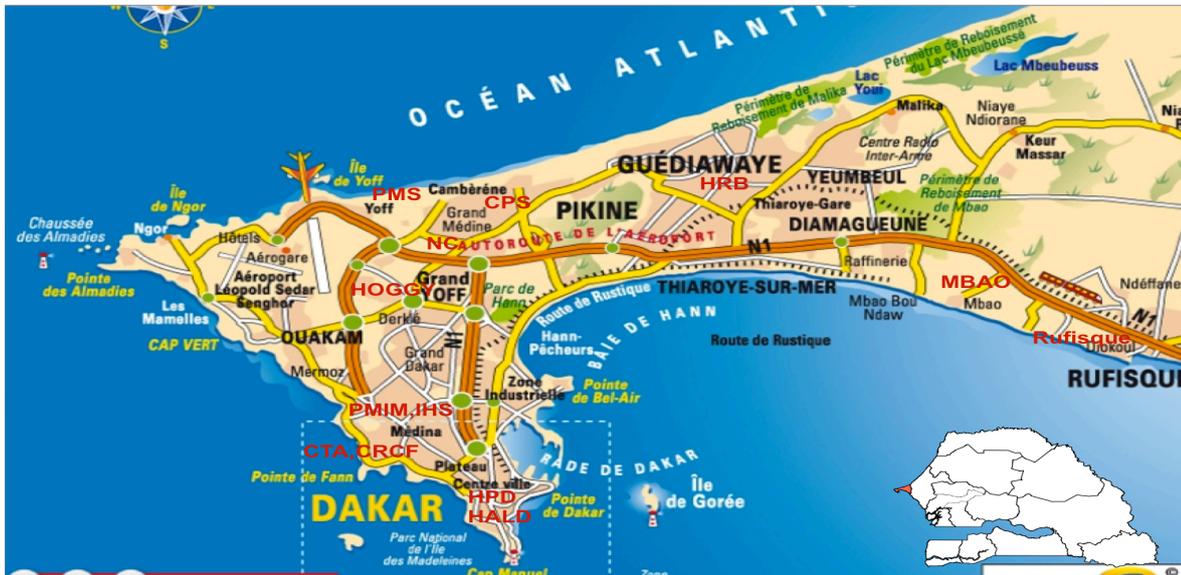


Figure 20. Carte de la région de Dakar, localisant les sites d'inclusion (maps.google.fr/)

Les sites d'inclusion sont représentés en couleur rouge: le Centre de Traitement Ambulatoire (CTA) et le Centre de recherche clinique et de formation (CRCFs) se trouvent à l'hôpital Fann, les hôpitaux principal de Dakar (HPD), Aristide Le Dantec (HALD), général de grand yoff (HOGGY), Roi Beaudouin (HRB), les centres de santé PMI Médina (PIMM), Institut d'Hygiène Sociale (IHS), Phylip Maguilène Senghor (PMS), Centre de Promotion de la Santé (CPS), Nabil Choucair (NC), Mbao et Rufisque.

I.2.2. Quantification de la charge virale (CV) plasmatique du VIH-1 pour évaluer les réponses virologiques

La charge virale (CV) plasmatique du VIH-1 a été mesurée pour uniquement les patients recrutés en 2007 avec la technique Abbott RealTime m2000sp/rt (Abbott, Chicago, USA) conformément aux indications du fabricant en utilisant les appareils m2000sp pour les extractions, et Abbott m2000rt pour les quantifications. Son principe repose sur une extraction et isolement de d'ARN et élimination de tout inhibiteur potentiel de l'amplification. Le dosage Abbott RealTime HIV-1 utilise la RT-PCR. Une séquence d'ARN non liée à la séquence cible du VIH-1 est introduite dans chaque échantillon au début de la préparation des échantillons. Cette séquence d'ARN non liée est simultanément amplifiée par RT-PCR et sert de contrôle interne (IC). La quantité de séquences du VIH présente à chaque cycle d'amplification est mesurée à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence sur l'appareil Abbott m2000. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le m2000 est proportionnel au log de la concentration d'ARN VIH-1 présente dans l'échantillon d'origine. La limite de détection de la technologie utilisée était de 40 copies/ml.

I.2.3. Génotypage du gène *pol* du VIH-1 pour identifier les mutations de résistance et les variants génétiques

- Extraction de l'ARN virale du VIH à partir du plasma

A partir du plasma obtenu après centrifugation des prélèvements de sang, l'ARN viral a été extrait par le kit QIAamp Viral RNA Extraction de Qiagen selon les instructions du fabricant. Le principe repose sur une concentration du plasma par une brève centrifugation, une lyse de la membrane virale pour la libération de l'ARN. Il y'a ensuite une précipitation avec de l'éthanol absolu puis un lavage sur colonne. En fin, il y'a une chromatographie d'éluion dans 50 à 60 µl.

- Amplification par RT-PCR ANRS

Pour les 48 prélèvements de 2007, tout le gène de la protéase et au moins les 240 premiers acides aminés du gène de la RT ont été amplifiés par la technique RT-PCR ANRS décrite dans le protocole de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>). Son principe repose sur l'association de l'étape de transcription inverse (de l'ARN viral en ADNc) et celle de l'amplification par PCR (de l'ADNc). Le tableau V contient l'ensemble des amorces utilisées pour cette RT-PCR.

Table V. Amorces utilisées pour le génotypage des patients

Site d'hybridation	Séquence (5'-3')	Sens
<i>Amorces externes</i>		
MJ3	AGTAGGACCTACACCTGTCA	S
MJ4	CTGTTAGTGCTTTGGTTCCTCT	AS
5'prot1	TAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC	S
3'prot1	GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCAGG	AS
G25rev	GCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAG	S
IN3	TCTATVCCATCTAAAAATAGTACTTTCTGATTCC	AS
<i>Amorces internes</i>		
A (35)	TTGGTTGCACTTTAAATTTCCATTAGTCCTATT	S
NE1 (35)	CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT	AS
5'prot2	TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCA	S
3'prot2	AATGCTTTTATTTTCTTCTGTCATG	AS
A (20)	ATTTCCATTAGTCCTATT	S
AV150	GTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAG	S
PolM4	CTATTAGCTGCCCCATCTACATA	AS
NE1 (20)	ATGTCATTGACAGTCCAGCT	AS

- Amplification par le Système Boehringer Expand Long Template PCR

A l'exception des échantillons de 2007, un fragment de 1865 pb englobant toute la protéase (PR) et les 420 premiers acides aminés de la transcriptase gène inverse (TI) a été amplifié avec la méthode *Boehringer Expand Long Template PCR*. Contrairement à la RT-PCR ANRS, l'ARN viral a été rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) de façon séparée avec le kit Expand RT, Boehringer Mannheim conformément aux indications du fabricant en utilisant l'amorce antisens

IN3. A partir de l'ADNc obtenu, un fragment d'environ 1850pb codant pour la totalité de la protéase et les 420 premiers acides aminés de la RT a été amplifié par une PCR nichée grâce au Système Boehringer Expand Long Template PCR System, comme décrit par Vergne *et al* en 2000 (Vergne *et al.*, 2000). Après vérification des PCRs, les produits ont été purifiés sur colonne soit avec le GeneClean Turbo Kit (Q-Biogen, MPbiomedicals, France) ou le kit QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France) conformément aux instructions des fabricants.

- Séquençage et analyse des séquences obtenues

Les produits de PCR purifiés ont été directement séquencés en utilisant le BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La détection des séquences par électrophorèse a été réalisée avec les séquenceurs 4 capillaires Applied Biosystems 3100 Avent à Dakar et 16 capillaires Applied Biosystems 3130XL à Montpellier.

Pour déterminer les sous-types et CRFs circulant chez les patients, les séquences consensus obtenues après correction sous le logiciel DNASTAR ont été alignées avec des séquences de référence du VIH-1 groupe M dans <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>. Les alignements et la reconstruction phylogénétique ont été réalisés avec le logiciel Clustal X version 1.83 en utilisant la méthode de distance Neighbor-Joining (NJ). La recherche de profils de recombinaison a été réalisée avec le logiciel SIMPLOT version 2.5 (Lole *et al.*, 1999). Pour déterminer les mutations de résistance chez les patients génotypés, nous avons utilisé la liste de l'OMS version 2008.

I.3. Présentation des résultats

- Caractéristiques et données immuno-virologique de la population

Concernant les 96 patients J0, 54% (n=52) étaient des hommes et 46% (n=44) étaient des femmes. La médiane d'âge était de 38 ans allant de 9 à 60 ans. Le taux de LTCD4 était disponible pour 82 patients et la charge virale plasmatique pour 79. Pour 91% (n=75/82) les LTCD4 était <350 cellules/mm³ avec une médiane de 102 cellules/mm³. Quant à la CV, elle était >4log¹⁰ pour 95% (n=75/79) des patients, avec une médiane de 5,05log¹⁰. Pour les 104 autres patients, nous avons une majorité (83,7%, n=87) de femmes. L'âge n'était connu que pour 97 patients avec une médiane de 32 ans (20-59 ans). La médiane des LTCD4 était de 519 cellules/mm³ pour les patients de 2003-2005 et de 639,5 cellules/mm³ pour ceux de 2007. La médiane de CV qui n'était disponible que pour les patients de 2007 était de 4.1log¹⁰.

- Fréquences et profils des résistances

L'analyse des séquences a montré que parmi les patients à J0 entre 1998-2001, 4 patients

avaient chacun une mutation de résistance pour la RT et une pour la protéase, donnant des fréquences de résistance transmise de 4,2% (n=4/96) et de 1% (n=1/96) respectivement. Les mutations associées à la résistance étaient: K65R (n=1), V75S (n=1), M41L (n=1) et K219N (n=1) pour les INTIs, et M46L les IP. Pour les 104 autres patients naïfs de 2003-2007, aucune mutation associée à une résistance à la RT n'a été retrouvée. Toutefois, 2 patients portaient les mutations G73S et I54T associées à la résistance aux IP, soit une fréquence de 1,9% (n=2/104). Sur l'ensemble des 200 patients étudiés, la fréquence de la résistance primaire était de 2% (n=4) pour la RT et 1,5% (n=3) pour la protéase.

Dans l'ensemble, nous avons montré dans cette étude que la résistance primaire était faible (<5%) et stable après 10 ans de circulation d'ARVs dans la capitale du Sénégal.

- Analyse phylogénétique des virus

L'analyse phylogénétique des 200 séquences isolées montre une grande diversité des souches circulant dans le pays.

Elle montre une prédominance du CRF02_AG à 64% (n=128) ainsi que la présence de nombreuses autres souches: 7% C (n=14), 5% B (n=10), 2,5% CRF06_cpx (n=5), 2% de chacun des variants D et CRF11_cpx (n=4), 1,5% de A3 et de G (n=3 pour chacun), 1% A (n=2) et 0,5% de chacun des variants A1 et CRF45_cpx (n=1). Un taux de recombinants uniques de 12,5% (n=25) a aussi été retrouvé impliquant en majorité les souches CRF02_AG.

I.4. Conclusion

Cette étude des résistances primaires du VIH-1 aux ARVs chez les patients non traités au Sénégal a montré une faible (<5%) transmission de virus résistants dans le pays. Elle a également confirmé les résultats antérieurs qui avaient décrit une grande diversité génétique des souches circulantes avec prédominance (64%) du CRF02_AG, variant le plus répandu en Afrique de l'Ouest.

Après 10 ans de circulation d'ARV dans un pays à ressources limitées comme le Sénégal, cette faible circulation de virus résistants pose aussi un certain nombre de questionnement: serait-elle liée à un programme performant? Ou une observance des patients? Ou particulièrement à une faible émergence de résistance chez les personnes sous traitement ARV?

Pour répondre à cette dernière question, nous avons mené une deuxième étude de résistance chez les patients VIH-1 positifs, sous traitement de première ligne au Sénégal dans le contexte du programme au niveau de la capitale (centre de référence et sites décentralisés) où circulent les ARVs depuis 1998.

Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Antiretroviral-Naive Patients from Senegal

Halimatou Diop-Ndiaye,¹ Coumba Toure-Kane,¹ Nafissatou Leye,¹ Ndeye Fatou Ngom-Gueye,²
Céline Montavon,³ Martine Peeters,³ and Souleymane Mboup¹

Abstract

To evaluate the presence of drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients in Dakar (Senegal), cross-sectional studies were conducted since the circulation of ARVs in the country. Protease and RT genes were sequenced in 96 baseline samples from patients included in the Senegalese Initiative for Antiretroviral Access treatment between 1998 and 2001 and for 104 samples from naive, recently diagnosed patients in 2003, 2005, and 2007. Phylogenetic analysis showed a predominance of CRF02_AG [128/200 (64%)] and a high genetic diversity with 10 other variants and 25 URFs. Analysis for the presence of drug resistance mutations according to the WHO SDRM 2009 list showed a prevalence of 4.16% for nucleoside inhibitors and 1.04% for protease inhibitors at the start of the structured Senegalese ART initiative and 1.9% for protease inhibitors at the time of scaling up. The prevalence in untreated patients remains low and stable, below 5% after 10 years of ARV circulation.

THERAPEUTIC FAILURES IN HIV-1 INFECTION are known to be frequently related to the selection of mutations associated with antiretroviral (ART) resistance under ARV pressure. The transmission of these resistant viruses to an ARV-naive patient might reduce the effectiveness of first-line ARV treatment¹ and increase the need to switch to second-line regimens, which are not available in many sub-Saharan Africa countries.² Variable rates, ranging between 2% and 10%, of drug resistance mutations in ARV-naive patients are described in resource-limited settings, where ARVs are now increasingly available through many initiatives for universal access.^{3,4} To track the emergence and transmission of HIV drug resistance in countries with ARV treatment scaling up, the World Health Organization has developed a minimum-resource method called the HIV drug resistance threshold survey (HIVDR-TS) among people recently infected with HIV, by preference young (<25 years) antenatal clinic attendees at first pregnancy.⁵ Although this strategy has been used in several African studies,^{6,7} it remains very difficult to implement in this population group in countries with a low HIV prevalence.⁸ In Senegal, HIV prevalence is low and stable, i.e., around 0.7% in the general population and 1.5% in pregnant women, but can reach up to 20% in vulnerable groups such as female commercial sex workers (<http://www.orlysoft.com/sites/rars/images/stories/Bulletin13.pdf>) or men who have sex with men (MSM).⁹

Through the governmental initiative ISAARV (Senegalese Initiative for ARV Access), highly active antiretroviral therapy (HAART) has been available since 1998 in Dakar, the capital city, and national coverage of ART scaling up has been promoted progressively since 2001. But before this governmental initiative, few ARV drugs were circulating in the country, mainly in the private sector and in an uncontrolled and unstandardized way with the frequent use of bitherapy only. To obtain information on the eventual transmission of drug-resistant strains, we investigated the prevalence of HIV-1 drug resistance in ARV-naive patients from the time of first availability of HAART to the time of greater access in the country.

A total of 200 samples from HIV-positive patients who declared based on an interview, that they were ARV treatment naive, were studied in Dakar, the capital city. Among them, 96 samples were obtained between 1998 and 2001 from randomly selected patients who started ART at the onset of the national ART program (ISAARV). An additional group of 104 samples was obtained between 2003 and 2007 from consecutively selected asymptomatic and more recently infected ARV-naive individuals: T CD4 lymphocyte (LTCD4)/mm³ greater than or equal to 350 ($n = 56$ between 2003 and 2005) or LTCD4/mm³ count greater than or equal to 500 and/or age under 25 years ($n = 48$ in 2007). All patients were recruited in the two major hospitals of the city. For the 96

¹Laboratoire de Bactériologie et Virologie, Hôpital Le Dantec, Dakar, Senegal.

²Centre de Traitement Ambulatoire/CHU Fann, Dakar, Senegal.

³UMR,145, IRD, Montpellier, France.

patients starting ART, 44 (46%) were women and 52 (54%) were men, with a median age of 38 years with ages ranging from 9 to 60 years. The LTCD4 count was <350 cells/mm³ for 91% (75/82) with a median of 102 cells/mm³ ranking from 1 to 622 cells/mm³. The viral load was above 4 log₁₀ copies/ml for 95% (75/79) and the median was 5.03 log₁₀ copies/ml ranging from 1.7 to 5.9 log₁₀ copies/ml. For the remaining more recently infected 104 patients, 87 (83.7%) were women and 17 (16.3%) were men. The median age was 32 years, ranging from 20 to 59 years ($n = 97$). The median of LTCD4 was 519 cells/mm³ (ranging from 350 to 814) in 2003–2005 and 639.5 cells/mm³ (ranging from 214 to 1673) in 2007. Viral load measurement was done for the last 48 samples and the median was 4.1 log₁₀ copies/ml ranging from 2.1 to 5.6 log₁₀ copies/ml.

For all patients, blood samples were collected on EDTA tubes and RNA was extracted from plasma using the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Except for the samples collected in 2007, a fragment of 1865 bp encompassing the entire protease (PR) gene and the 420 first amino acids of the reverse transcriptase (RT) gene was amplified as previously described.¹⁰ Briefly, after reverse transcription, a nested polymerase chain reaction (PCR) using IN3/G25rev as the outer primers and AV150/PolM4 as the inner primers was performed. For the 48 samples collected in 2007, a nested reverse transcriptase (RT)-PCR developed by the ANRS French Resistance study group was done separately for PR and RT

genes using, respectively, 5'Prot1/3'Prot1 and MJ3/MJ4 as the outer primers and A35/NE1 20 and 5'Prot2/3'Prot2 as the inner primers (<http://www.hivfrenchresistance.org/tab2007.html>). The entire protease gene and at least the first 240 amino acids of the RT gene were then amplified. PCR products were purified (Qiagen, Courtaboeuf, France and GeneClean Turbo kit, Q-Biogen, Illkirch, France) and directly sequenced on ABI 3100 Avant or ABI 3130XL using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). HIV-1 subtype and CRF designations were done by phylogenetic tree analysis using the neighbor-joining method and the reliability of the branching orders with the bootstrap approach (with 100 bootstrap replicates) implemented in Clustal X version 1.83. Recombinant analysis was also done by similarity analysis followed by bootscanning with SimPlot version 3.5.1 software by moving a 400-bp window along the alignment with 20-bp increments (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware>).

Figure 1 shows the subtype/CRF distribution among the 200 samples. Despite the low prevalence in the country, a high diversity was found. CRF02-AG predominated and represented 128/200 (64%) of the strains, and 10 additional HIV-1 variants were also identified in decreasing order of importance: C [14/200 (7%)], B [10/200 (5%)], CRF06-cpx [5/200 (2.5%)], D [4/200 (2%)], CRF11-cpx [4/200 (2%)], A3 [3/200 (1.5%)], G [3/200 (1.5%)], A [2/200 (1%)], A1 [1/200 (0.5%)], and CRF45 [1/200 (0.5%)]. In addition, 25 (12.5%) samples were unique recombinants (URFs) and the CRF02_

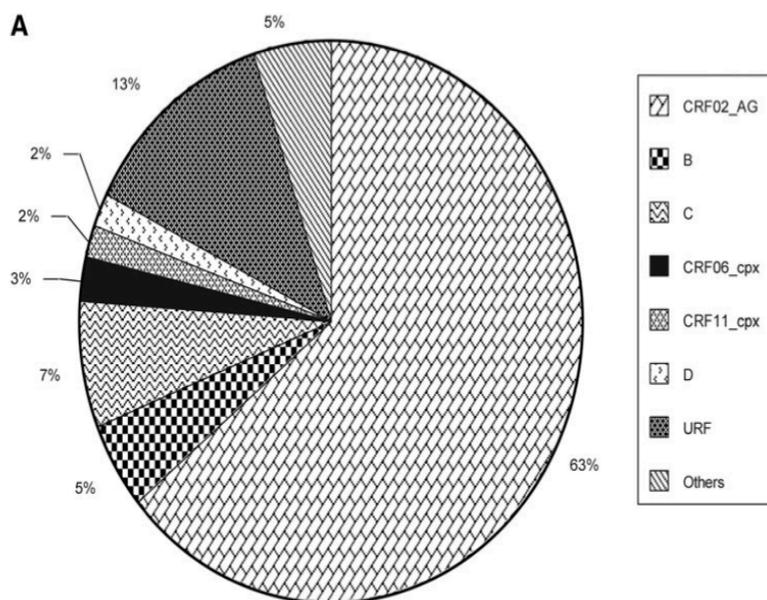


FIG. 1. (A) The distribution of 200 HIV-1 variants found in the study and **(B, C)** phylogenetic tree analyses for HIV-1 *pol* sequences. **(A)** Distribution of HIV-1 variants; Others represents subtypes/CRF that are present in less than 2% (A, 1%; A1, 0.5%; A3, 1.5%; G, 1.5%; CRF45, 0.5%). **(B)** Phylogenetic tree analysis of the partial *pol* gene of the 96 HIV-1 strains collected between 1998 and 2001. Phylogenetic tree analysis was done with the neighbor-joining method implemented by Clustal X version 1.83 and bootstrap values (100 replicates) were also implemented with Clustal X version 1.83. The length of the gapstripped *pol* alignment was 1490 unambiguously aligned nucleotides. Newly identified sequences are shown by a dotted line.

The reference sequences for classifying HIV-1 subtypes/CRF were obtained from the HIV Los Alamos databases and are in black. Only bootstrap values above 90 are shown. Unique recombinant sequences identified in this study are indicated with an asterisk (*). **(C)** Phylogenetic tree analysis of the partial *pol* gene of the 102 HIV-1 strains collected in 2003, 2005, and 2007. Phylogenetic tree analysis was done with the neighbor-joining method implemented by Clustal X version 1.83 and bootstrap values (100 replicates) were also implemented with Clustal X version 1.83. The length of the gapstripped *pol* alignment was 1497 unambiguously aligned nucleotides. Newly identified sequences were in gray for the 2003 and 2005 samples and in a dotted line for the 2007 samples. The reference sequences for classifying HIV-1 subtypes/CRF were obtained from the HIV Los Alamos databases and are in black. Only bootstrap values above 90 are shown. Unique recombinant sequences identified in this study are indicated with an asterisk (*).



FIG. 1. (Continued).

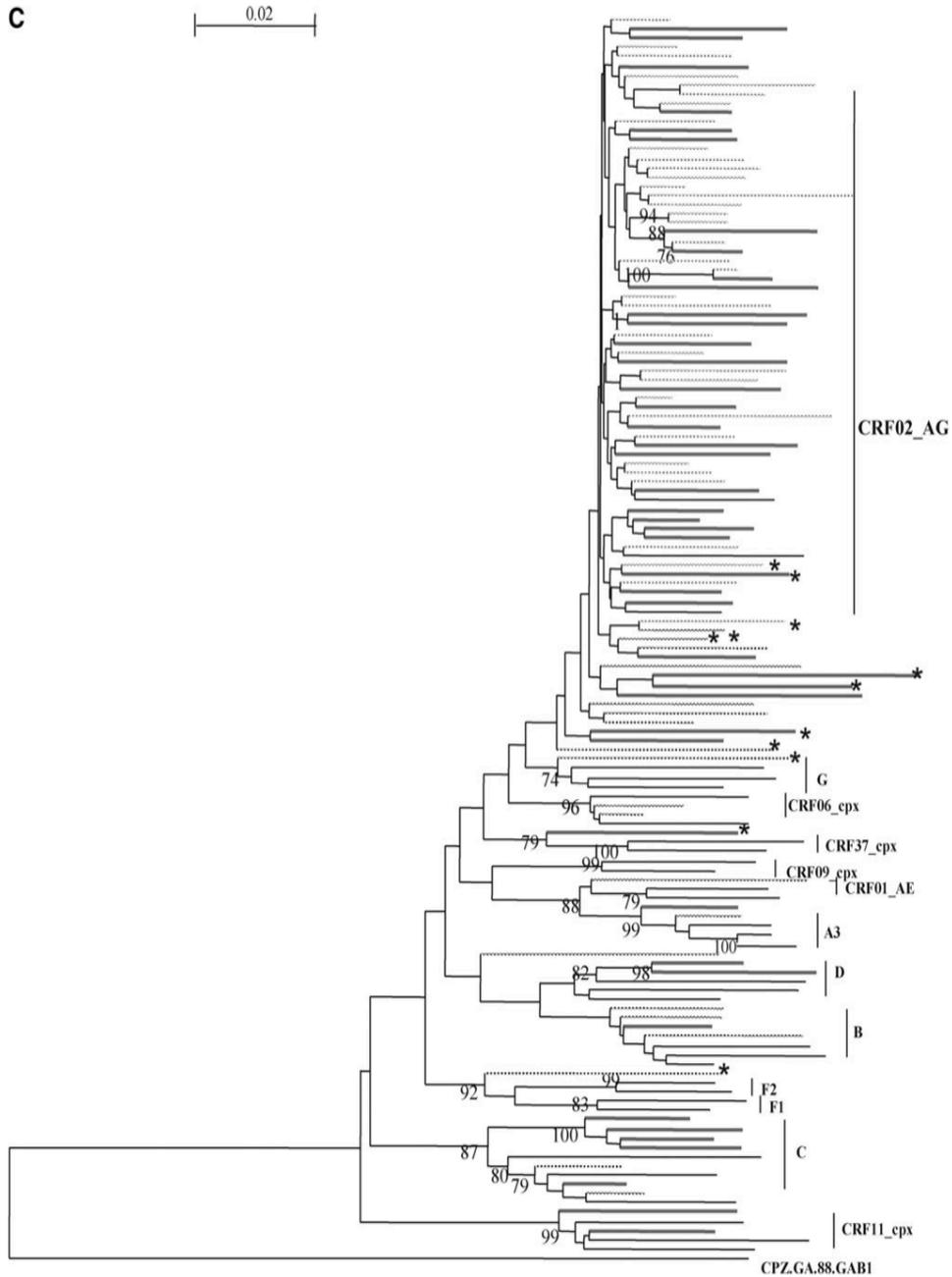


FIG. 1. (Continued).

AG strain was the most common HIV variant involved in the recombinant profiles.

Amino acid sequences were analyzed to determine the presence of mutations in protease and RT genes at positions known to be associated with ARV resistance by using the latest (2009)¹¹ version of the WHO list of mutations for surveillance studies (<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/AgMutPrev>

.cgi). Analysis of the RT gene showed that four patients who started ART between 1998 and 2001 were infected with HIV-1 strains containing an NRTI drug resistance mutation: K65R ($n=1$), V75S ($n=1$), M41L ($n=1$), and K219N ($n=1$). No mutations associated with NNRTI resistance were identified and one additional patient was infected with a strain harboring the M46L mutation associated with PI resistance. For

9. Wade AS, Larmarange J, Diop AK, Diop O, Gueye K, Marra A, Sene A, Enel C, Niang Diallo P, Toure Kane NC, Mboup S, and Desgrees-du-Lou A: Reduction in risk-taking behaviors among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and other STIs. ELIHoS Project, ANRS 12139. *AIDS Care* 2010;3:1–6.
10. Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, Mboup S, Mulanga-Kabeya C, Saman E, Jourdan J, Reynes J, and Delaporte E: Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B HIV-1 strains: Evidence of many minor drug-resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):3919–3925.
11. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CA, van de Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, and Shafer RW: Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance: 2009 update. *PLoS ONE* 2009;4(3):e4724.
12. Hamel DJ, Sankalé JL, Eisen G, Meloni ST, Mullins C, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, and Kanki PJ: Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: Changes in HIV diversity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23(10): 1189–1196.
13. Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, Gaye-Diallo A, Delaporte E, Peeters M, and Mboup S: Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16(6):603–609.

Address correspondence to:

*Coumba Toure-Kane
Laboratoire de Bactériologie et Virologie
Hôpital Le Dantec
30 Avenue Pasteur
Dakar 221, Senegal*

E-mail: ctourekane@yahoo.co.uk

Chapitre II. Evaluation des réponses virologiques et de la résistance acquise à 12 et 24 mois de traitement ARV à Dakar.

Ce travail est soumis dans le *journal of medical virology* et l'article correspondant est détaillé ci-dessous.

II.1. Introduction

Au Sénégal, grâce à l'initiative sénégalaise d'accès aux ARV, le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) sous traitement antirétroviral (ART) a beaucoup augmenté. Selon les directives nationales, chaque PVVIH au Sénégal, bénéficie de la quantification de la charge virale et du taux de lymphocyte TCD4 tous les 6 mois après la mise sous ARV. Toutefois, cette quantification de la charge virale n'est effectuée que dans le laboratoire de référence à la capitale dakaroise. Depuis 2002, les mutations de résistance aux ARVs ont été évaluées régulièrement dans une cohorte structurée et les taux d'échec virologique étaient comparables à ceux observés dans les pays industrialisés (Vergne *et al.*, 2003; De Beaudrap *et al.*, 2012; Laurent *et al.*, 2005). Des données récentes ont été également décrites sur la résistance aux ARV chez des patients adultes en suspicion d'échec immunologique ou clinique, mais aucune donnée n'a été signalée sur le taux d'échec virologique chez les patients suivis dans un contexte de vie réelle. Le faible taux de résistance primaire observé dans notre première étude de la thèse était-il le reflet d'une faible fréquence de résistance chez les patients sous traitement ?

Pour répondre à ces préoccupations, l'objectif de cette deuxième étude de la thèse était d'évaluer l'efficacité virologique et la fréquence de résistances aux ARV chez les patients traités en première ligne après 12 et 24 mois et suivis dans les programmes et structures nationaux selon l'approche de santé publique de l'OMS.

II.2. Méthodologie

Cette étude transversale a été conduite chez des patients VIH-1 positifs, sous traitement ARV de première ligne depuis 12 et 24 mois dans 13 centres de suivi à Dakar : CTA, CRCF/MI, CPS, HALD, HRB, HPD, PMIM, IHS, NC, HOGGY, PMS, MBAO et Rufisque (figure 24). La méthodologie utilisée est la même que celle détaillée dans la première étude, avec juste quelques différences.

Comme détaillé dans la première étude de résistance, pour étudier les réponses virologiques, la charge virale (CV) plasmatique a été mesurée avec la technologie Abbott RealTime m2000sp/rt (Abbott, Chicago, USA) conformément aux indications du fabricant. La limite de détection de la

technologie était toujours de 40 copies/ml. Tous les patients ayant une $CV \geq 1000$ copies/ml ont été définis comme étant en échec virologique et avaient été génotypés en utilisant la technique de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>). Après les extractions de l'ARN viral avec le kit RNA viral QIAmp (Qiagen, Courtaboeuf, France), les produits de pcr ont été purifiés par les kits Qiagen et GeneClean, puis séquencés avec la méthode du Big dye Terminator.

Les alignements et la reconstruction phylogénétique ont été réalisés avec le logiciel Seaview 4.0. L'analyse des recombinants a été effectuée dans le logiciel Simplot version 3.5.1. L'analyse des mutations de résistances dans les gènes de la protéase et de la RT a été faite en utilisant l'algorithme de l'ANRS via la base de données de Stanford Version 6.3.0 (dernière mise à jour 06/05/13) (<http://hivdb.stanford.edu/>).

II.3. Résultats

- Caractéristique de la population

Parmi un total de 635 patients inclus, 430 ont été recrutés entre 2009 et 2011 dans le cadre de l'étude ANRS12186. Les 205 autres échantillons ont été prélevés entre 2011 et 2013 chez des patients choisis au hasard parmi ceux sous traitement de première ligne dans l'ISAARV à 12 et 24 mois (± 2). Sur les 630 patients inclus, 391 étaient à M12 et 244 à M24 plus ou moins 2 mois. Globalement, 62,8% (399/635) étaient des femmes. La médiane d'âge était de 40,4 ans (rangée entre 33,5 et 43 ans à travers les sites). Suivant les régimes de première ligne de traitement, 73,9% (469/635) recevaient la Zidovudine (AZT) et 147 (23,1%) recevaient le Ténofovir (TDF). Seuls 17 (2,7%) étaient sous d4T.

- Réponses virologiques des patients

La charge virale plasmatique a été obtenue pour l'ensemble des 635 patients inclus. La figure 21 suivante montre les répartitions de la charge virale en fonction du mois de suivi. Sur l'ensemble des patients inclus, 516 (81,2%) avaient une charge virale plasmatique indétectable ($CV < 50$ copies/ml), 62 (9,8%) entre 50 et 1000 copies/ml et 57 (9%) avaient une charge virale plasmatique supérieure à 1000 copies/ml, et ont donc été définis comme étant en échec virologique à 12 et 24 mois de traitement ARV de première ligne à Dakar. Ce taux d'échec était de 7,9% (31/391) à M12 et 10,7% (26/244) à M24 et la différence n'était pas significative ($p=0,304$).

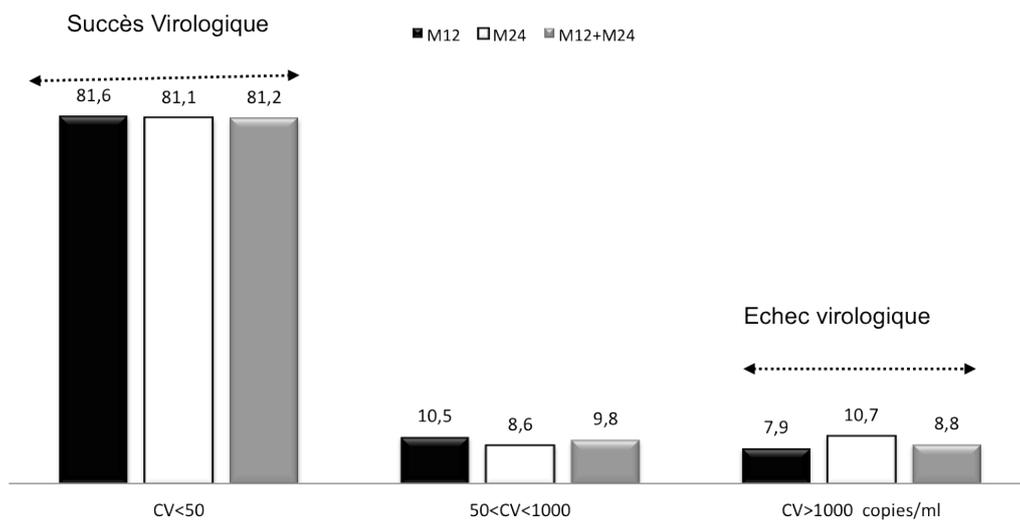


Figure 21. Répartition des réponses virologiques à M12 et M24 de TAR à Dakar.

Dans l'ensemble des sites d'inclusion et sur la base du seuil 1000 copies/ml, le taux d'échec virologique varie entre 3,7% (CPS) et 15,4% (HALD), 10% (CTA) et 16,7% (IHS) à M12 et M24 respectivement. La figure 22 ci-dessous montre les taux d'échecs virologiques retrouvés selon les sites en fonction de la durée du traitement.

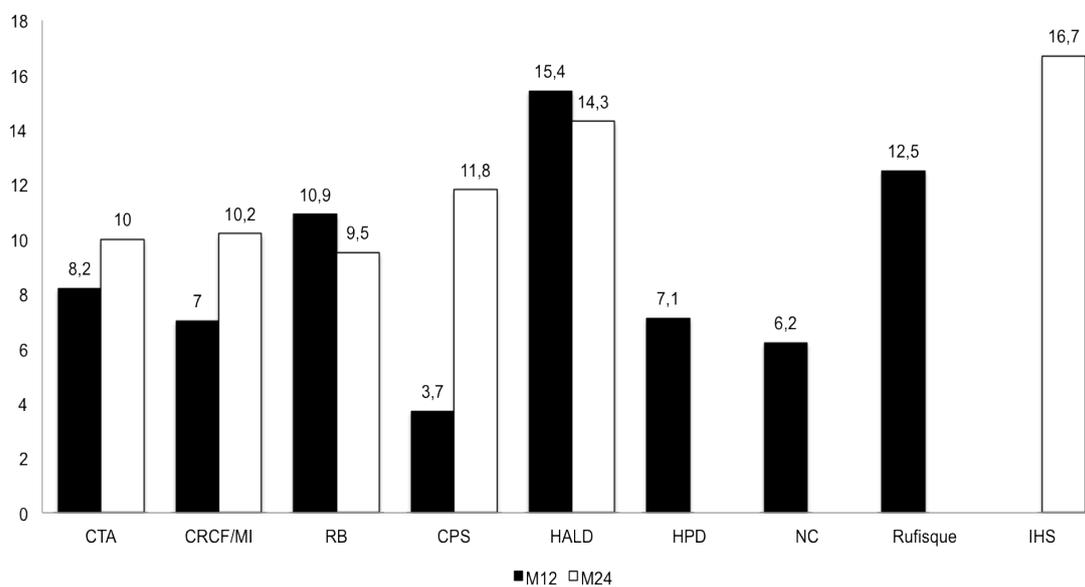


Figure 22. Taux d'échec virologique dans les sites de recrutement.

Selon les schémas thérapeutiques, le taux d'échec virologique était de 10,1% (n=28/278) chez les patients recevant la NVP et 8,1% (29/357) chez ceux recevant EFV (p=0,462). Pour les INNTI, il était de 10,9% (n=16/147) chez les patients recevant TDF, 7,9% (n=37/469) chez ceux recevant AZT (p=0,336).

- les Fréquences et profils des mutations de résistance

Parmi les 57 patients qui avaient une charge virale ≥ 1000 copies/ml, 55 avaient été génotypés avec succès dans les gènes de la RT et de la protéase, et un en RT seule. Le tableau VI ci-dessous montre les mutations sélectionnées par les patients résistants à leurs traitements.

Tableau VI. Profils des mutations chez les patients résistants aux traitements de première ligne

Patient	Moi de suivi	Charge virale	Sous-type	Traitement ARV	Résistance aux ARVs de seconde ligne	Mutations
5294	M12	1087113	URF (C/A3/C)	TDF+3TC+EFV	ABC, DDI, ETR, RPV	K65R, M184V, A98G, V106I, Y181C
6270	M12	254 557	A3	TDF+3TC+EFV		K103N, M184V
8648	M11	50 825	C	TDF+3TC+EFV	ABC, DDI, ETR, RPV	K65R, K101E, Y181C, H221Y
4971	M12	6009	C	d4T+3TC+NVP	ABC, DDI, TDF, RPV	K65R, K101E
7219	M11	45063	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP	ETR, RPV	V90IV, A98G, Y181C, M184V
6490	M11	24965	CRF02 AG	TDF+3TC+NVP	ETR, RPV	M184I, Y181C, H221Y
8626	M12	413 673	CRF02 AG	TDF+3TC+EFV	ABC, DDI, RPV	K65KR, M184V, Y188L
3806	M12	45657	CRF02 AG	d4T+3TC+NVP	ETR, RPV	M184V, A98AS, Y181C, H221Y
4039	M12	661589	CRF02 AG	TDF+3TC+EFV	RPV	K101E
5090	M12	2365	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP	RPV	K103N, Y181C, M184V
9307	M12	284 872	CRF02 AG	TDF+3TC+EFV		K103KN
7295	M12	4860	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		K103KN
858	M12	74 246	CRF02 AG	TDF+3TC+EFV		K103N, M184V
8105	M12	300 745	CRF02 AG	AZT+3TC+EFV		K103N, M184V, T215Y
4921	M12	93000	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		M184V, T215F, G190A
8621	M12	10 229	CRF02 AG	TDF+3TC+NVP		M184V, Y181C
6489	M13	79126	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP	RPV, SQV/r	L10V, I15V, K20I, K103KN, Y181C, M184V
5094	M14	1123920	CRF02 AG	AZT+3TC+EFV	ETR, RPV	V90I, K101E, M230LM
5335	M12	162933	CRF06 cpx	TDF+3TC+EFV	ABC, DDI, RPV	K65R, M184I, L100I, K103N
7164	M14	146903	CRF11 cpx	TDF+3TC+EFV		G190E
5864	M12	135891	CRF13 cpx	AZT+3TC+EFV		M184V, T215SY, K103N
5172	M12	3508	D	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
7179	M14	162327	URF (CRF02 AG/A3/CRF02 AG)	TDF+3TC+EFV		K103N
5699	M11	59429	URF (CRF02 AG/CRF09_cpx)	TDF+3TC+NVP	ETR, RPV	K70EK, M184V, Y181C, H221HY
4496	M24	53040	A1	AZT+3TC+NVP		M184V, G190A
3270	M24	12670	A3	AZT+3TC+NVP	ETR, RPV	Y181CFGV, M184V, T215FY
056	M25	35137	A3	AZT+3TC+EFV		K103KN
6039	M22	37125	C	d4T+3TC+NVP	RPV	D67DN, K70R, K103KN, Y181C, M184V, K219EK
10264 (RT)	M24	5 973	C	AZT+3TC+EFV	RPV	K101EK, M184V
2931	M24	24854	C	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
5755	M24	17773	C	AZT+3TC+EFV		V106MV
6460	M22	37463	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
4274	M22	240991	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
7123	M24	257 546	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP	ABC, SQV/r	L10V, I15V, K20I, M41LM, V106A, M184V, T215FY
6835	M24	753 449	CRF02 AG	AZT+3TC+EFV		K103KN
3181	M24	839687	CRF02 AG	AZT+3TC+EFV		K103N
9105	M24	286 512	CRF02 AG	AZT+3TC+EFV		K103N
3014	M24	2953	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
3081	M24	3502	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		K103N, M184V
3619	M25	1100	CRF02 AG	AZT+3TC+NVP		M184MV
9724	M24	382 322	CRF11 cpx	TDF+3TC+NVP	ABC, DDI, RPV	K65R, Y181C, M184V
3354	M24	32442	CRF11 cpx	AZT+3TC+NVP	ETR, RPV	K103N, E138Q, M184V, T215F
3435	M23	427820	CRF13 cpx	AZT+3TC+EFV		K103N
9945	M24	156 480	D	AZT+3TC+EFV	ABC, TDF, ETR, RPV	M41L, Y181C, M184V, L210W, T215Y, A98G, K103H, G
3429	M24	1951	D	AZT+3TC+EFV		K103N, M184V

Parmi ces patients génotypés, 80,4% (45/56) avaient au moins une mutation de résistance selon l'algorithme de l'ANRS, soit un taux de résistance global de 7,1% (45/634). Le taux de résistance parmi les patients en échec virologique, avec au moins une mutation de résistance était estimé à 77,4% (24/31) à M12 et 84% (21/25) à M24. Ces taux de résistance varient de 50% à 100% à travers les 4 sites majeurs: 62,5% (10/16) et 90,9% (10/11) au CTA; 100% (4/4) et 83,3% (5/6)

au CRCF/MI; 100% (1/1) et 50% (1/2) au CPS, 80% (4/5) et 100% (2/2) à RB à M12 et M24 respectivement. Au niveau des autres sites, tous les patients en échecs virologiques étaient résistants à au moins une molécule antirétrovirale de leur traitement. Globalement, 30 (53,6%) des 56 patients séquencés étaient résistants aux deux classes INTI + INNTI, 1 (1,8%) à la classe des INTI seule, 12 (21,4%) à la classe des INNTI seule et 2 aux 3 classes INTI+INNTI+IP (SQV/r).

Les mutations les plus fréquemment observées étaient M184V, K103N et Y181C. La figure 23 montre les mutations de résistance selon la durée du traitement.

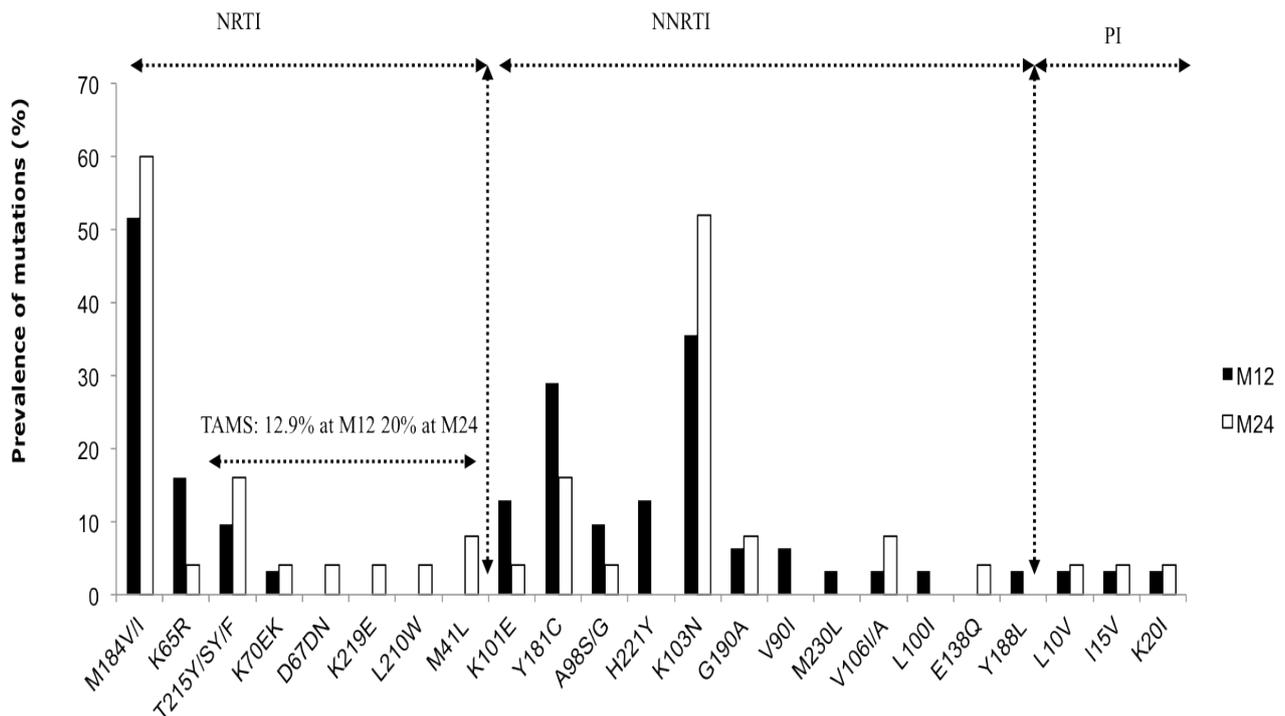


Figure 23. Prévalences des mutations de résistance à M12 et M24.

Pour la classe des INTI, 51,6% (16/31) à M12 et 60% (n=15/25) à M24 ont sélectionné la mutation M184V/I qui est associée à la résistance au couple 3TC/FTC (p=0,720). Les TAMs ont été retrouvés avec 12,9% (4/31) à M12 (T215S/Y/F, K70E/R) et 20% (5/25) à M24 (T215F/Y, K70R, D67N, K219E, M41L et L210W) (p=0.724). La mutation K65R était retrouvée chez 5 (16,1%) et 1 (4%) patients à M12 et M24 respectivement.

Les mutations de résistance aux INNTI les plus couramment sélectionnées étaient la K103N retrouvée à 35,5% (n=11) à M12 et 52% (n=13) à M24, (p=0.332). Elle est suivie par la Y181C retrouvée à 29% (n=9) à M12 et 16% (n=4) à M24 (p=0.406). Nous avons aussi trouvé plusieurs autres mutations comme indiquées dans la figure 22.

Globalement, 14,3% (n=8), 10,7% (n=6) et 3,6% (n=2) des patients étaient prédits résistants à ABC, DDI et TDF respectivement. Aussi, 17,9% (n=10) et 33,9% (n=19) étaient aussi prédits

d'être résistant à etravirine (ETR) et rilpivirine (RPV) respectivement.

- Répartition des sous-types

L'analyse phylogénétique des 55 séquences de VIH-1 isolées montre que le variant le plus courant est le CRF02_AG [47.3%, n = 26]. D'autres souches ont aussi été retrouvées: 14,5% (n=8) de sous-type C; 5,5% (n=3) de D; 7,3% (n=4) de A3; 5,5% (n=3) de CRF11_cpx, 3,6% (n=2) de CRF13_cpx et 1 (1,8%) de chacune des souches A1, CRF06_cpx, et CRF49_cpx. Un total de 10,9% (n=6) des échantillons était des recombinants uniques.

II.4. Conclusion

Ces résultats démontrent l'efficacité des premières lignes de traitement ARV selon les recommandations du programme national à Dakar. Ils renforcent l'idée selon laquelle des niveaux élevés de suppression VL peuvent être obtenus dans les pays à ressources limitées. Cependant, il est nécessaire d'améliorer le suivi de la thérapie antirétrovirale (ART), la surveillance de la résistance acquise surtout dans des sites décentralisés, et de renforcer l'éducation pré-thérapeutique afin d'assurer une efficacité à long terme des premières et deuxièmes lignes de TAR actuellement disponibles au Sénégal.

Ces deux études de résistance ont confirmé la très grande diversité génétique du VIH-1 au Sénégal, avec une augmentation du sous-type C dans la population générale et une présence importante de recombinants URFs. Aussi, il a été décrit que le sous-type C du VIH-1 constituait le virus majoritaire dans le groupe des HSHs au Sénégal. Ce dernier pourrait servir de pont épidémique vers la population générale. Il s'avère donc nécessaire de documenter au sein des HSHs, la fréquence des doubles infections qui sont à l'origine des variants recombinants. Ceci a constitué le troisième objectif de notre thèse.

Chapitre III. Fréquence élevée de doubles infections du VIH-1 avec des sous-types et CRFs différents ou identiques chez les HSHs au Sénégal

Ce travail a fait l'objet d'une publication et l'article correspondant est exposé ci-dessous dans sa version finale telle que publiée (page 107-115).

Leye N, Vidal N, Ndiaye O, Diop-Ndiaye H, Wade AS, Mboup S, Delaporte E, Toure-Kane C and Peeters M. High frequency of HIV-1 infections with multiple HIV-1 strains in men having sex with men (MSM) in Senegal. **Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases Journal**. 20; 206–214 (2013).

III.1. Introduction

Comme indiqué dans les chapitres précédents, l'épidémie de VIH-1 dans le monde est extrêmement hétérogène au niveau de la diversité des souches circulantes et aussi au niveau des prévalences de l'infection dans les populations. De la même façon que des co-infections entre les VIH-1 et 2 existent, des doubles infections avec des variants différents du VIH-1 groupe M ont été décrites. Ces dernières sont à l'origine du nombre important de recombinants. Les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSHs) constituent un groupe vulnérable quel que soit le pays. Ils courent un risque plus élevé de contracter des infections sexuellement transmissibles (IST) et le VIH (*Baral et al.*, 2007; *Ananworanich et al.*, 2008; Van Griensven et De Lind van Wijngaarden, 2010).

Le Sénégal est caractérisé par une prévalence de VIH faible et stable dans la population générale, mais élevée chez les HSHs. Le pays démontre une grande diversité génétique du VIH avec une prédominance du CRF02_AG dans la population générale et les femmes professionnelles du sexe. Cependant, le sous-type C est prédominant chez les HSHs où 80% ont affirmé avoir des partenaires sexuelles féminines. Compte tenu de la prévalence élevée du VIH et des comportements à risques chez les HSHs, l'objectif de cette étude était d'estimer dans ce groupe, l'ampleur des infections multiples avec des variants différents ou identiques du VIH-1 groupe M en utilisant la méthode MHA (multi-region hybridization assay) récemment développée pour l'Afrique de l'Ouest.

III.2. Méthodologie

III.2.1. Populations d'étude

Les prélèvements de HSHs utilisés dans cette étude rétrospective proviennent 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. En effet, un pair leader était en charge du

recrutement dans des endroits tels que bars et boîtes de nuit et tout autre lieu où les HSHs se rencontraient et de bouche à oreille.

III.2.2. Détection avec la MHA des doubles infections du VIH-1

Compte-tenu des variants circulants au Sénégal, nous avons utilisé la MHA mise au point par Vidal 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). Cette méthode utilise des sondes fluorescentes, définies suite à l’inspection d’alignements de séquences nucléotidiques du VIH-1, révélant de courtes portions spécifiques à chaque sous-type ou CRF, dans lesquelles elles ont pu être dessinées.

III.2.2.1. Dessin de la sonde spécifique aux variant A3 circulant au Sénégal

Dans cette présente étude, nous avons ajouté dans la région *vpu* une sonde supplémentaire qui permet de détecter les virus du sous-sous-type A3 circulant au Sénégal. La figure 24 ci-dessous montre une portion d’alignement de la zone d’hybridation de la sonde *vpuA3*.

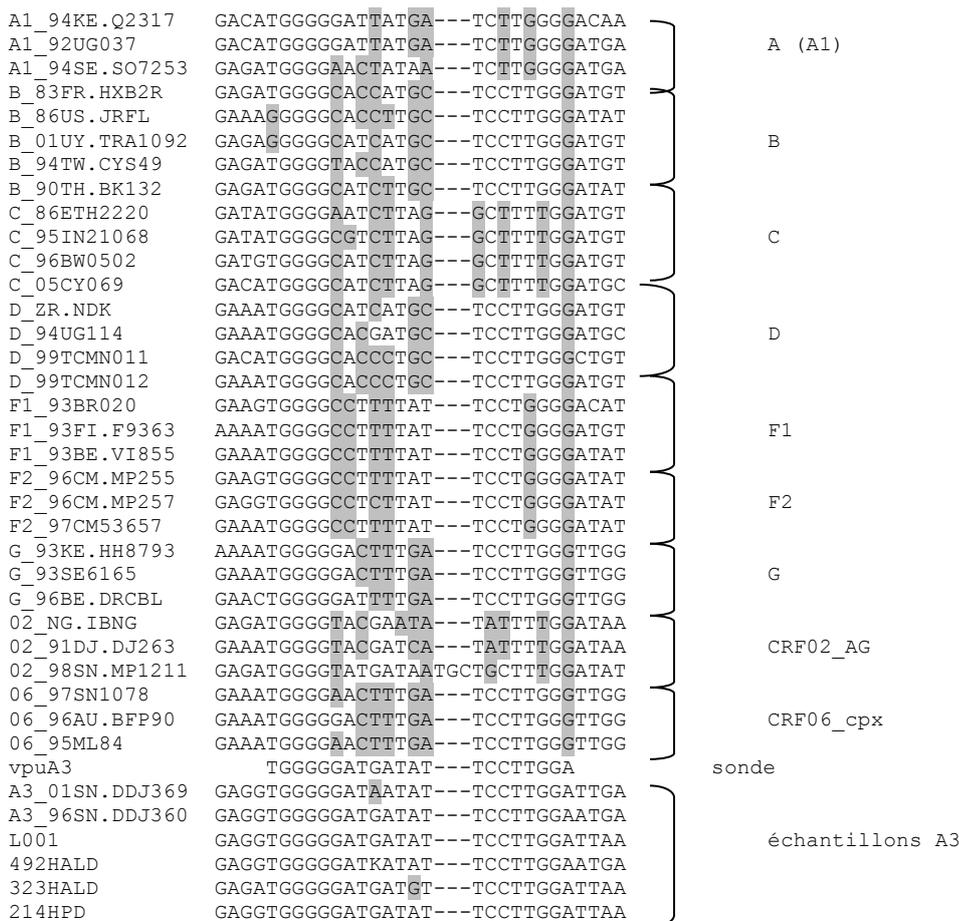


Figure 24. Portion d’alignement de la zone d’hybridation de la sonde *vpuA3*

La sonde *vpuA3* (flèche) est positionnée sur des séquences de sous-sous-type A3 (au-dessous de la séquence de la sonde), et par rapport à des séquences HIV-1 de référence représentatives des autres variants (au-dessus de la sonde). Les mésappariements par rapport à la séquence de la sonde *vpuA3* sont surlignés en gris.

La séquence de cette sonde A3 comporte au plus 1 mésappariement par rapport aux séquences des virus ciblés. En revanche, le nombre de mésappariements par rapport aux séquences des virus qui ne sont pas de sous-sous-type A3 varie de 4 à 8, ne permettant pas l'accrochage de la sonde sur de tels variants. Malheureusement, en raison de la proximité phylogénétique avec les autres souches du sous-type A dans *gag*, le dessin d'une sonde spécifique des variants A3 n'a pas été possible dans cette région.

III.2.2.2. Extraction de l'ADN du VIH

L'extraction de l'ADN viral a été réalisée à partir des Cellules Mononucléées du Sang périphérique des HSHs inclus dans l'étude. Nous avons utilisé le kit QIAmp Viral DNA extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant

III.2.2.3. Processus technique de la MHA

Un premier round d'amplification avec les amorces externes a été réalisé pour chacune des deux régions *gag* et *vpu* du génome. Pour *gag* p17, le couple d'amorces G00-G25 a été utilisé et pour *vpu*, nous avons utilisé le couple MHVPU1-MHVPU2.

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, comme indiqué dans le chapitre Diversité Génétique, 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.

III.2.2.4. Confirmation des réponses obtenues en MHA par séquençage des gènes gag p17 et vpu et analyses phylogénétiques

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. Les réactions de séquence ont été réalisées directement avec 1µl de produit de deuxième round avec les amorces MHgag4 et MHvpu4 en utilisant le kit BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). L'électrophorèse a été réalisée sur séquenceur capillaire Applied Biosystems 3130XL. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées de la même façon que décrite dans 1.2.4.2.

Certains échantillons dont les chromatogrammes étaient trop chargés en signaux de fluorescence ont subi une purification sur colonne, avec le kit GeneClean (Q-Biogen, MPbiomedicals, France) selon les indications du fabricant. Dans certains cas, notamment lorsque la réactivité en MHA ne correspondait pas aux sous-types/CRF de la séquence isolée, certains échantillons ont été repris en PCR et séquencés de manière indépendante sur un site différent (Dakar) afin de confronter les résultats obtenus avec les deux PCR. Pour plus de simplicité, nous qualifierons ces PCR de PCR-2 par la suite.

III.2.2.5. Confirmation de réponses MHA par isolement de molécules uniques

La technique de SGA utilisant l'ARN rétro-transcrit en ADN complémentaire a été utilisée pour les patients ayant une charge virale relativement élevée. Pour les échantillons dont le plasma n'était pas disponible, nous avons réalisé des dilutions de l'ADN.

- Confirmation par SGA (Single Genome Amplification)

La SGA permet d'isoler à la fois les variants majoritaire et minoritaire circulant dans le sang des patients sélectionnés. La manipulation de chaque échantillon est réalisée de manière totalement indépendante des autres. La SGA consiste à réaliser le séquençage de tous les produits de PCR obtenus à partir des dilutions de l'ADNc dont la concentration sera déterminée à partir de la charge virale du patient. Elle nécessite donc au préalable une quantification de la charge virale du VIH-1 des patients et une extraction de l'ARN viral.

Dans un premier temps, nous avons quantifié la charge virale avec la technologie de Nuclisens EasyQ version 2.0 (Biomerieux, Lyon, France). Par la suite, l'ARN viral a été extrait en utilisant le kit QIAamp Viral RNA Extraction de Qiagen et en suivant les instructions du

fabricant. La synthèse de l'ADNc était effectuée par rétro-transcription de l'ARN viral en utilisant les amorces G25 et MHvpu2 avec l'enzyme Expand reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France) en suivant les indications du fabricant. La concentration (en copies/ μ l) de l'ADN complémentaire obtenu a été déterminée à partir de la charge virale plasmatique et du volume de plasma nécessaire à l'extraction. Une fois l'ADNc obtenu, plusieurs dilutions ont été réalisées pour rechercher celle qui donnait au maximum 30% de PCR positives. Cette étape assure que chacun des amplicons obtenus est issu d'une molécule unique (suivant une loi de Poisson) (*Shriner et al.*, 2004; *Palmer et al.*, 2005). Nos essais ont été faits avec une fenêtre de dilutions comprises entre 0,5 et 10 copies/ μ l de l'ADNc. Celle ayant donné au maximum 30% de PCR positives a été utilisée. Avec cette dilution, nous avons réalisé 48 à 96 réactions de PCR identiques sur plaque comme décrit en III.6.2.1. Toutes les PCRs positives ont été directement séquencées et soigneusement examinées pour vérifier l'absence de doubles pics, signe que l'on aurait prélevé plus d'une molécule. Les séquences retenues, qualifiées d'uniques, ont été comparées avec celles obtenues avec l'ADN après alignement et analyses phylogénétiques sous Seaview.

La MHA a été réalisée à partir des premiers rounds des dilutions sur les molécules uniques issues de la SGA pour confirmer les doubles réactivités obtenues avec le produit initial de PCR issu de l'ADN.

- Confirmation par séquençage à partir des dilutions d'ADN

Pour le HSH1193 dont le plasma n'était pas disponible, nous avons réalisé des dilutions allant de 1/2 à 1/16 de l'ADN. Pour chaque dilution, nous avons effectué huit PCR identiques dans les mêmes conditions d'amplification décrites précédemment dans la partie III.6.2.2. Les produits de PCR obtenus ont été purifiés avec le kit GeneClean (Q-Biogen, MPbiomedicals, France) et séquencés. Toutes les séquences ont été alignées ensemble et comparées avec la séquence initiale obtenue de l'ADN. La confirmation des doubles réactivités par MHA a aussi été recherchée pour chaque dilution positive.

III.3. Présentation des résultats

Parmi les 69 HSHs traités en MHA, 55 (79,7%) étaient positifs en sonde en *gag* p17 et 59/69 (85,5%) en *vpu*. Un total de 47 (68,1%) étaient positifs en MHA sur les deux gènes *gag* et *vpu*. Parmi ces derniers, 9 (19,1%) étaient CRF02_AG, 1 (2,1%) B/D, 22 de sous-type C (46,8%), 4 (8,5%) étaient des URF 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. Parmi les 29 échantillons identifiés de sous-type C par MHA en *gag*, 15 (57,7%) avaient réagi avec les deux sondes C1 et C2. Nos 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.

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. La comparaison des séquences C du HSH1157 et de la patiente 478-HALD de la population générale a confirmé le mélange des variants VIH-1 entre les femmes à faible risque et les HSHs.

III.4. Conclusion

Notre étude a montré une fréquence élevée de doubles infections avec des sous-types/CRFs différents, mais aussi avec un même sous-type. La différence des prévalences dans la population générale et chez les HSHs révèle l'importance d'une prévalence élevée et des comportements à risque dans les doubles infections et le mélange des variants de VIH-1, pouvant entraîner l'émergence et la diffusion de nouveaux recombinaisons. Cela démontre la nécessité d'accroître les efforts pour soutenir les programmes de prévention et de prise en charge ciblant les HSHs au Sénégal.

De plus, ce travail a confirmé la présence importante du sous-type C chez les HSHs, avec différents variants Alors que le sous-type B est majoritaire dans les pays du nord. Ce sous-type C prédomine dans le monde et surtout dans le sud de l'Afrique. Il était aussi nécessaire de documenter l'origine du sous-type C du VIH-1 dans le pays, notamment chez les HSHs et ceci a fait l'objet du 4ème objectif de la thèse.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

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 Montpellier1 (UM1), 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 Kuyl and Cornelissen, 2007; Pernas et al., 2006; Munoz-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 FSW (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 (Larmarange 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 (Toure-Kane et al., 2000; 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 heterologous 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 (Larmarange 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://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). Phylogenetic analysis used maximum likelihood method under PhyML v3.0 and aLRT SH-like branch supports (Guindon et al., 2009; Anisimova and Gascuel, 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 *gagC1bis* 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, CRF06_cpx and CRF22_01A1. ('-' means no probe reactivity).

Sample id	Subtype/CRF MHA <i>gag</i> p17	Subtype/CRF MHA <i>vpu</i>	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	
MSM3013	-	G	
MSM1083	CRF02	-	
MSM1292	CRF02	-	
MSM3022	CRF02	-	
MSM3007	C	-	
MSM1169	C	-	
MSM1106	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	
MSM1151	CRF02	CRF02	
MSM1165	CRF02	CRF02	
MSM4040	CRF02	CRF02	
MSM1215	CRF02	CRF02	
MSM2054	CRF02	CRF02	
MSM1078	B/D	B/B	
MSM1225	C	C	
MSM1100	C	C	
MSM1021	C	C	
MSM1037	C	C	
MSM1185	C	C	
MSM1043	C	C	
MSM1092	C	C	
MSM1177	C	C	
MSM1189	C	C	
MSM1196	C	C	
MSM1065	C	C	
MSM1095	C	C	
MSM1257	C	C	
MSM1246	C	C	
MSM1293	C	C	
MSM1147	C	C	
MSM1072	C	C	
MSM1088	C	C	
MSM1184	C	C	
MSM3012	C	C	
MSM2034	C	C	
MSM1203	C	C	
MSM2016	CRF02	B/D	URF
MSM1005	A	B/D	URF
MSM3017	F	CRF02	URF
MSM1122	G	CRF02	URF
MSM2015	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
MSM2005	CRF02+B/D	CRF02	Dual infection
MSM1157	CRF02+C	CRF02+C	Dual infection
MSM1209	A+G	CRF02	Dual infection
MSM1115	B/D+A	B/D	Dual infection
MSM1193	C	C+B/D	Dual infection
MSM1187	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 With heterologous probes in gag*	Subtype/CRF vpu		Mismatches With heterologous probes in vpu	Remarks
	MHA	Sequence		MHA	Sequence		
MSM1268	CRF22+A	CRF01	1 CRF01, 1 A	–	CRF09		Non-specific crossreactivity
MSM1046	B/ D+A+CRF22	B	3 CRF22, 3 A	–	B		Non-specific crossreactivity?
MSM2015	CRF22+A	CRF01	1 CRF01, 1 A	CRF02	CRF02		Non-specific crossreactivity
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 crossreactivity?
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 crossreactivity?
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
MSM1169	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-

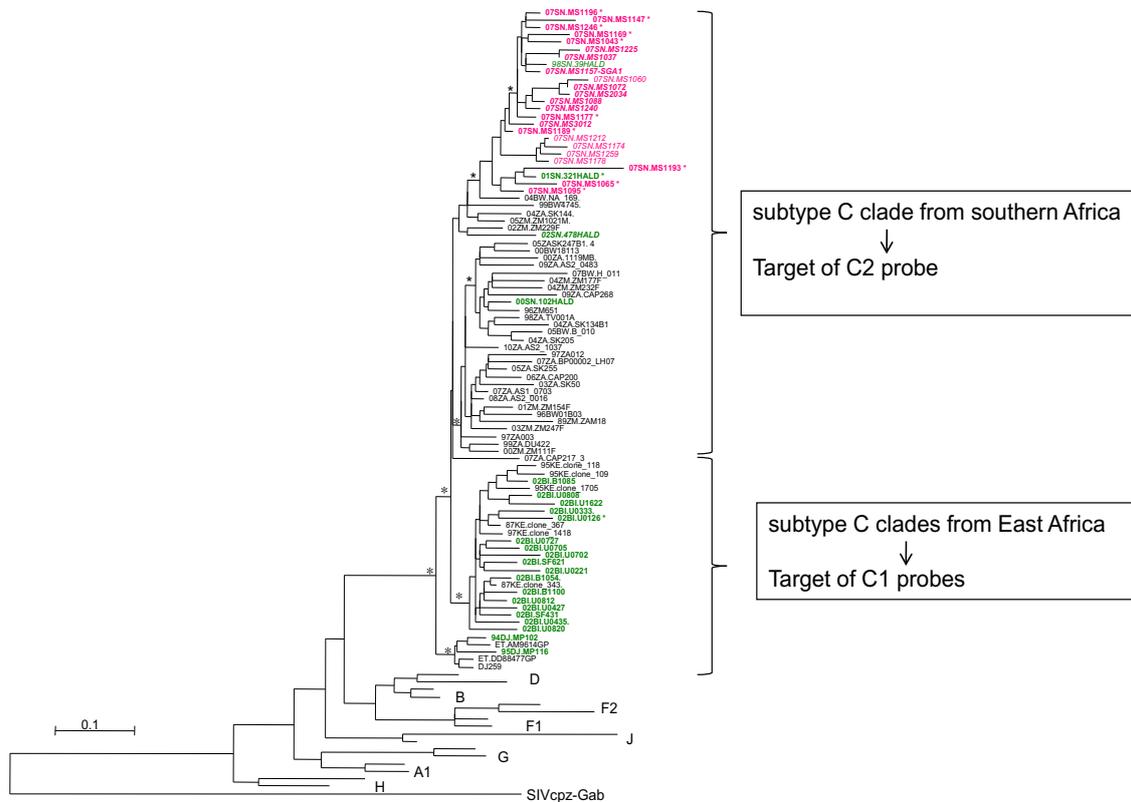


Fig. 1. Phylogenetic tree illustrating the two subtype C clades in the *gag* p17 region (234 bp) for which the C1 and C2 probes were designed. The strains highlighted in pink correspond to samples from MSM analyzed in this study, strains highlighted in green are from samples reported in our previous study on the development of the MHA assay (Vidal et al., 2013), in black are reference sequences from Genbank. Strains that were simultaneously reactive with *gag*C1 and *gag*C2 probes are indicated in bold and with an asterisk, strains reactive with *gag*C1 probe only are in bold and italic, those reactive with *gag*C2 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 tested in the MHA assay in this and our previous study. 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.)

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 *gag*C1 and four with *gag*C2, suggesting that the sample could also be dually infected with one strain that hybridises 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 *gag*F 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

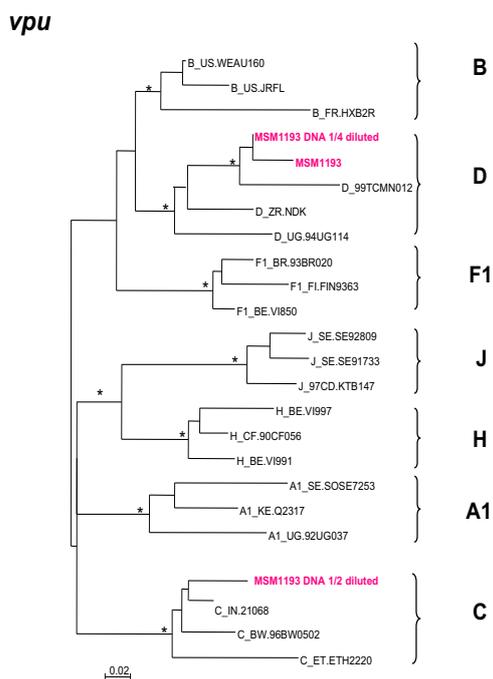


Fig. 2. Confirmation of dual infection with HIV-1 subtypes C and D. Phylogenetic tree analysis in the *vpu* gene (229 bp) of sequences obtained from patient MSM1193 obtained by direct sequencing of undiluted and diluted proviral DNA. The sequences from the patient are highlighted in pink. Branch support 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.)

results with the CRF06 probe, and negative responses with the CRF02 probes in contrast to the bulk sequence. Moreover, independent PCR and sequence analysis on proviral DNA in Dakar characterized the sample as CRF06_cpx in *vpu* and as A3/CRF02_AG in the p24 *gag* regions (Ndiaye et al., 2013). These results show that this patient is at least co-infected with CRF06_cpx and CRF02_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 CRF02_AG

Sample MSM1157 was only sequenced in *vpu* and was identified as CRF02_AG but hybridized with both C and CRF02_AG probes in *vpu* and with C1, C2 and CRF02_AG probes in *gag*, indicating at least a dual infection with CRF02_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 CRF02_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 CRF02_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

CRF02_AG with CRF02_AG probe. Therefore SGA confirmed unambiguously the triple infection with two different C subtype strains and CRF02_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 (Toure-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

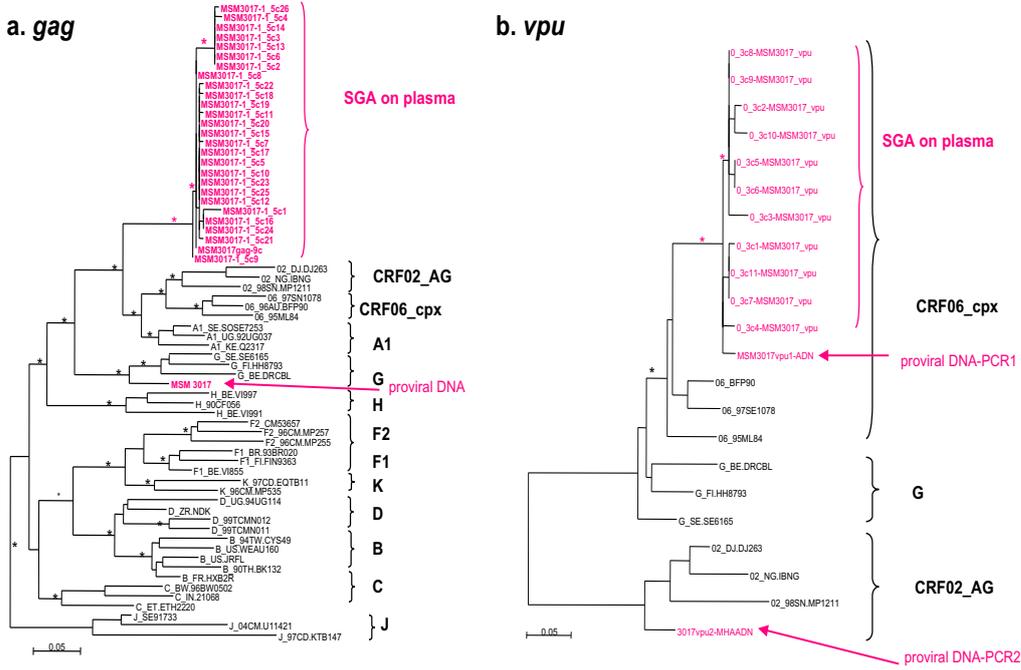


Fig. 3. Co-infection with multiple HIV-1 strains. Phylogenetic tree analysis in the *gag* p17 (333 bp) and *vpu* gene (184 bp) of sequences obtained from patient MSM3017 obtained by direct sequencing of undiluted proviral DNA and by single genome amplification (SGA) of viral RNA in plasma. The sequences 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.)

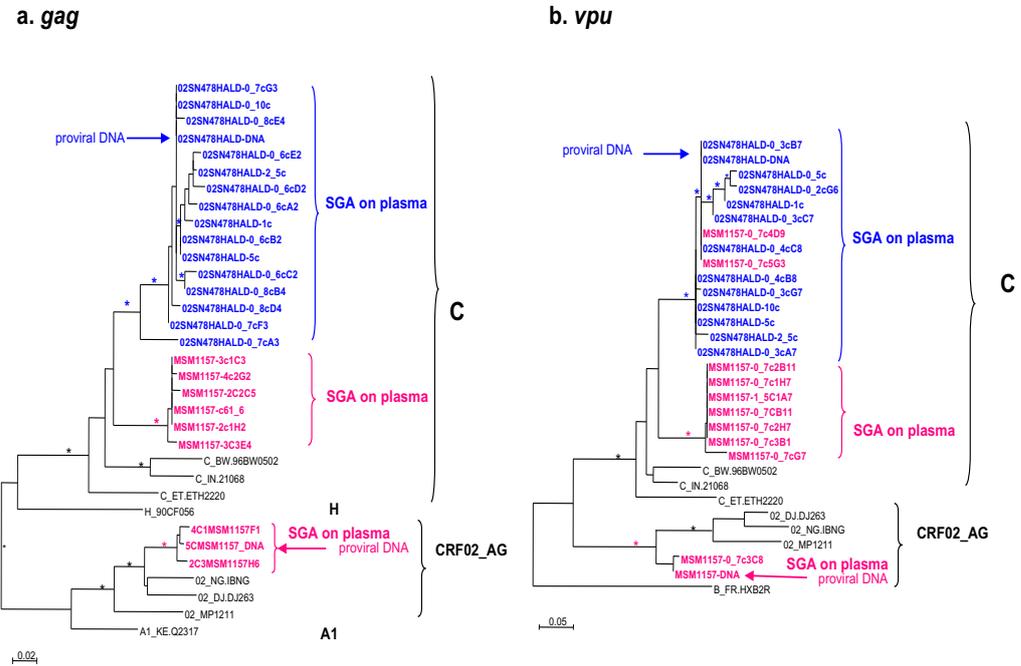


Fig. 4. Confirmation of co-infection with two HIV-1 subtype C variants plus CRF02_AG and evidence for exchange of HIV-1 strains between MSM and female HIV-1 infected patients in Senegal. Phylogenetic tree analysis in the *gag* p17 (311 bp) and *vpu* gene (173 bp) of sequences obtained from patient MSM1157 (in pink) and female patient O2SN478HALD (in blue) obtained by direct sequencing of undiluted 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 (46% 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. Findings

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 ELIHos 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 ELIHos project in the MSM population.

References

- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Baral, S., Sifakis, F., Cleghorn, F., Beyrer, C., 2007. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low and middle-income countries 2000–2006: a systematic review. *PLoS Med.* 4, e339.
- Chohan, B.H., Piantadosi, A., Overbaugh, J., 2010. HIV-1 superinfection and its implications for vaccine design. *Curr. HIV Res.* 8, 596–601.
- Cornelissen, M., Pasternak, A.O., Grijzen, M.L., Zorgdrager, F., Bakker, M., Blom, P., Prins, J.M., Jurriaans, S., van der Kuyf, 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, 539–547.
- Delatorre, E.O., Bello, G., 2012. Phylodynamics 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., Dièye, 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. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52, 249–252.
- Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, C., Leye, N., Ngom-Gueye, N.F., Montavon, C., Peeters, M., Mboup, S., 2010. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naïve patients from Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 1133–1138.
- Gottlieb, G.S., Nickle, D.C., Jensen, M.A., Wong, K.G., Grobler, J., Li, F., Liu, S.L., Rademeyer, C., Learn, G.H., Karim, S.S., Williamson, C., Corey, L., Margolick, J.B., Mullins, J., 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363, 619–622.
- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.F., Gascuel, O., 2009. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol. Biol.* 537, 113–137.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25, 679–689.
- Herbinger, K.H., Gerhardt, M., Piyasirisilp, S., Mloka, D., Arroyo, M.A., Hoffmann, O., Maboko, L., Bix, D.L., Mmbando, D., McCutchan, F.E., Hoelscher, M., 2006. Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya region, Tanzania. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 599–606.
- Hoelscher, M., Dowling, W.E., Sanders-Buell, E., Carr, J.K., Harris, M.E., Thomschke, A., Robb, M.L., Bix, 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.
- 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.
- Larmarange, J., Desgrées-du-Lou, A., Enel, C., Wade, A.S., Groupe ELIHoS, 2009. Homosexuality and bisexuality in Senegal: a multiform reality. *Population* (E) 64, 635–666.
- Larmarange, J., Wade, A.S., Diop, A.K., Diop, O., Gueye, K., Marra, A., Degrees-du-Lou, A.D., ELIHoS 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, e13189.
- Munoz-Nieto, M., Pérez-Alvarez, L., Thomson, M., Garcia, V., Ocampo, A., Casado, G., Delgado, E., Miralles, C., de Parga, E.V., Sierra, M., Contreras, G., Nájera, R., 2008. HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual infection with subtypes B and G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 337–343.
- Ndiaye, H., Tchiakpe, E., Vidal, N., Ndiaye, O., Diop, A.K., Peeters, M., Mboup, 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.
- Pernas, M., Casado, C., Fuentes, R., Perez-Elias, M.J., Lopez-Galindez, C., 2006. A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primo-infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 12–18.
- Poteat, T., Diouf, D., Drame, F.M., Ndaw, M., Traore, C., Dhaliwal, M., Beyrer, C., Baral, S., 2011. HIV risk among MSM in Senegal: a qualitative rapid assessment of the impact of enforcing laws that criminalize same sex practices. *PLoS One* 6, e28760.
- Redd, A.D., Mullis, C.E., Serwadda, D., Kong, X., Martens, C., Ricklefs, S.M., Tobian, A.A., Xiao, C., Grabowski, M.K., Nalugoda, F., Kigozi, G., Laeyendecker, O., Kagaayi, J., Sewankambo, N., Gray, R.H., Porcella, S.F., Wawer, M.J., Quinn, T.C., 2012. The rates of HIV superinfection and primary HIV incidence in a general population in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* 206, 267–274.
- Rodriguez, M.A., Ding, M., Ratner, D., Chen, Y., Tripathy, S.P., Kulkarni, S.S., Chatterjee, R., Tarwater, P.M., Gupta, P., 2009. High replication fitness and transmission efficiency of HIV-1 subtype C from India: implications for subtype C predominance. *Virology* 385, 416–424.
- Salazar-Gonzalez, J.F., Bailes, E., Pham, K.T., Salazar, M.G., Guffey, M.B., Keele, B.F., Derdeyn, C.A., Farmer, P., Hunter, E., Allen, S., Manigart, O., Mulenga, J., Anderson, J.A., Swanstrom, R., Haynes, B.F., Athreya, G.S., Korber, B.T., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H., 2008. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol.* 82, 3952–3970.
- Sarkar, R., Sengupta, S., Mullick, R., Singh, N.B., Sarkar, K., Chakrabarti, S., 2009. Implementation of a multiregion hybridization assay to characterize HIV-1 strains detected among injecting drug users in Manipur, India. *Intervirology* 52, 175–178.
- Smith, D.M., Wong, J.K., Hightower, G.K., Ignacio, C.C., Koelsch, K.K., Petropoulos, C.J., Richman, D.D., Little, S.J., 2005. HIV drug resistance acquired through superinfection. *AIDS* 19, 1251–1256.
- Solomon, S.S., Mehta, S., Latimore, A., Srikrishnan, A.K., Celentano, 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, S7.
- Ssemwanga, D., Ndembi, N., Lyagoba, F., Bukonya, J., Seeley, J., Vandepitte, J., Grosskurth, H., Kaleebu, 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, 357–365.
- Toure-Kane, C., Montavon, C., Faye, M.A., Gueye, P.M., Sow, P.S., Ndoye, I., Gaye-Diallo, A., Delaporte, E., Peeters, M., Mboup, S., 2000. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 603–609. <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/senegal/>; accessed on 19 June 2013.
- van der Kuyl, A.C., Cornelissen, M., 2007. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology* 4, 67.
- Vidal, N., Diop, H., Montavon, C., Butel, C., Bosch, S., Ngole, E.M., Touré-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. *Infect. Genet. Evol.* 14, 73–82.
- Wade, A.S., Larmarange, J., Diop, A.K., Diop, O., Gueye, K., Marra, A., Sene, A., Enel, C., Niang Diallo, P., Toure Kane, N.C., Mboup, S., Desgrées-du-Lou, A., 2010. Reduction in risk-taking behaviors among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and other STIs. *ELIHoS Project, ANRS 12139. AIDS Care* 22, 409–414.
- Woodman, Z., Mlisana, K., Treurnicht, F., Abrahams, M.R., Thebus, R., Karim, S.A., Williamson, C., Caprison 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., Foley, B., Schultz, A.K., Macke, J.P., Bulla, I., Stanke, M., Morgenstern, B., Korber, B., Leitner, T., 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7, 25.

Chapitre IV. Origine géographique et temporelle du sous-type C du VIH-1 au Sénégal

Ce quatrième objectif de la thèse a aussi fait l'objet de publication et l'article correspondant est exposé ci-dessous dans sa version finale telle que publiée (p120-131).

Jung M, **Leye N**, Vidal N, Fargette D, Diop H, Toure Kane C, Gascuel O, Peeters M. The Origin and Evolutionary History of HIV-1 Subtype C in Senegal. **PLoS ONE** ; 7(3): e33579, (2012).

IV.1. Introduction

Comme décrit dans la partie II (Diversité génétique du VIH), les différents sous-types et recombinants du VIH-1 groupe M sont inégalement répartis à travers le monde. L'analyse de cette répartition mondiale révèle que le sous-type C est le variant le plus répandu dans le monde et représente près de la moitié (48%) des infections. Après la description de l'existence d'une communauté d'hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH) au Sénégal, la stigmatisation exercée sur eux a fait que près de 95% d'entre eux ont des partenaires sexuelles féminines. Ceci leur permet d'échapper à la répression et garder leur double vie secrète. La caractérisation moléculaire réalisée dans ce groupe à risque en 2009 avait montré une majorité du sous-type C (45%), contre moins de 5% dans la population générale. Ce niveau de sous-type C retrouvé chez les HSHs au Sénégal n'a jamais été atteint en Afrique de l'Ouest. Notre étude moléculaire avait pour objectif de documenter pour la première fois en Afrique de l'Ouest, l'origine géographique et temporelle de l'ancêtre commun aux souches du sous-type C du VIH-1 circulant dans la population générale, et chez les HSHs au Sénégal.

IV.2. Méthodologie

- Collection et préparation des séquences C

Les séquences ont été collectées dans la base de données publique de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). La pureté du sous-type C de toutes les séquences téléchargées a été vérifiée par l'application web *REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool* (De Oliveira *et al.*, 2005). Nous avons construit un arbre NJ avec la référence HXB2 comme *outgroup* pour ne sélectionner qu'une séquence au hasard parmi celles qui étaient identiques ou ayant un lien épidémiologique proche (cas de prélèvements séquentiels de patients ou de transmissions intra-couple ou mère-enfant). Un total de 18 nouvelles séquences a été isolé avec le système Biohiring et aligné avec celles provenant de la base de Los Alamos par la méthode L-INS-i (Katoh *et al.*, 2005),

en utilisant le logiciel MAFFT version 6 (Kato et al., 2002). Afin d'éliminer les sites contenant un nombre important de gaps, l'alignement a été manuellement édité à l'aide du logiciel MEGA version 5 (Tamura et al., 2011).

- Détermination de l'origine géographique du sous-type C au Sénégal

Pour déterminer l'histoire évolutive de l'ensemble des séquences, nous avons construit un arbre de Maximum de vraisemblance avec le logiciel PhyML v3.0 (Guindon et Gascuel, 2003) sous le modèle *general time reversible* avec une proportion de sites invariables et une loi gamma de catégorie 4 (GTR+I+ Γ 4) (Posada et Crandall, 2001). L'option SPR (*subtree pruning and regrafting*) était choisie pour explorer l'espace des arbres. Les supports de branches ont été déterminés par la méthode *approximate likelihood ratio test* (aLRT) (Anisimova et Gascuel, 2006) pour évaluer la confiance dans la topologie. L'arbre PhyML obtenu était tiré du logiciel FigTree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Par la suite, avec les séquences du Sénégal et celles qui sont proches, nous avons inféré un deuxième arbre de vraisemblance où les supports de branche estimés étaient obtenus par la méthode du *bootstrap*. Un arbre bayésien calculé par MrBayes version 3.1 (Ronquist et Huelsenbeck, 2003) a permis de vérifier la topologie et les résultats obtenus.

- Détermination de la date d'introduction du sous-type C

Sur les 56 séquences du Sénégal, les dates des ancêtres communs les plus récents (tMRCA) et les estimations des taux de substitution sont estimés avec la méthode Bayésienne MCMC à l'aide du logiciel BEAST v1.6.1 (Drummond et Rambaut, 2007). Ces estimations sont faites en adéquation avec le modèle GTR+I+ Γ 4 (comme pour les analyses phylogénétiques) sous l'hypothèse de trois horloges moléculaires : stricte, relâchée en log-normal et en exponentiel (Drummond et al., 2006). Sous le modèle *Bayesian Skyride*, nous avons calculé l'histoire démographique avec l'option *Time-aware* (Minin et al., 2008). Enfin, la convergence était vérifiée avec le logiciel Tracer v1.5. L'extraction des résultats et les estimations des facteurs de Bayes étaient aussi vérifiées.

IV.3. Présentation des résultats

- Analyse globale des séquences

Un total de 3081 séquences provenant de 4 continents et 61 pays dont 22 du continent Africain, 7 de l'Amérique, 9 de l'Asie et 23 de l'Europe a été analysé. Nous avons dans un premier temps exploré l'origine géographique de l'épidémie du VIH-1 de sous-type C au Sénégal à l'aide d'un arbre de maximum de vraisemblance. Ces séquences couvrent un fragment de 1011 pb entre les positions 2253 et 3263 sur le gène *pol* du HXB2. Parmi les séquences utilisées, un total de 56 provenait du Sénégal: 24 séquences de HSHs et 14 de la population générale provenant de Los

Alamos, ainsi que les 18 nouvelles séquences. La majorité des séquences (67,7%) provenaient de l'Afrique et plus précisément du sud du continent. Pour l'Asie la majorité venait de l'Inde, et du Brésil pour l'Amérique. Quant à l'Europe aucune prédominance particulière n'a été notée selon un pays ou une zone donnée.

Globalement, la plupart des séquences d'Asie et d'Amérique sont regroupées en clades, le reste étant sous forme de clades marginaux ou dispersés. Les séquences de l'Afrique de l'Est étaient aussi regroupées. Quant aux séquences de l'Europe et celles de la population générale du Sénégal, elles étaient dispersées dans l'arbre avec plusieurs origines géographiques, principalement en Afrique, en Asie et le sud de l'Amérique. Les souches des HSHs forment un clade net et distinct (support aLRT de 98,9%) avec à sa racine, celles de l'Afrique Australe, suggérant une introduction unique du sous-type C dans ce groupe. Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'arbre où les 43 codons connus pour être associés à des mutations majeures de résistance ont été supprimés.

- Origine géographique du C au Sénégal

Pour mieux décrire l'origine géographique du sous-type C au Sénégal, un deuxième arbre contenant les 56 séquences du Sénégal et 121 autres séquences proches de celles-ci a été inféré. Parmi ces séquences, la plupart (83%) provenaient du continent africain.

L'analyse des arbres phylogénétiques obtenus soit par maximum likelihood (PhyML) soit avec la méthode Bayésienne (MrBayes) montre des résultats similaires. Elle confirme l'hypothèse d'introductions multiples du sous-type C du VIH-1 dans la population générale, qui semblent provenir d'une part de l'Afrique Australe et d'autre part de l'Afrique de l'Est. L'hypothèse d'une introduction unique du sous-type C dans le groupe des HSHs est aussi confirmée par le fait qu'à proximité du seul clade contenant les séquences de ce groupe, se placent les souches de l'Afrique Australe dont beaucoup de la Zambie. Cela suggère que l'ancêtre commun des C des HSHs serait originaire de l'Afrique australe.

- Origine temporelle du C au Sénégal

Les estimations des dates des ancêtres communs faites avec le logiciel BEAST étaient assez similaires entre les horloges moléculaires stricte et relâchée en log-normal, et semblent avoisiner les substitutions par site et par année. Très peu de différences sont à noter entre les résultats des deux alignements (avec ou sans les sites associés aux mutations de résistance). La date de l'ancêtre commun des souches collectées au Sénégal est estimée à 1972 et celle des souches isolées chez les HSHs à 1988. Ainsi, la date de l'ancêtre commun aux souches du Sénégal est estimée au début des années soixante-dix et celle de l'ancêtre commun aux souches des HSHs au début des années quatre-vingt, environ dix ans après.

IV.4. Conclusion

Notre étude suggère plusieurs introductions des virus de sous-type C au Sénégal. D'une part, de multiples introductions dans la population générale et d'autre part, une introduction unique dans la population des HSHs. Toutefois, une expansion majeure de ce variant est observée chez ces derniers, soulignant l'importance des comportements à haut risque dans la propagation du virus. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence un mélange entre les variants C des HSHs et ceux de la population générale pour quelques cas. Du fait que la plupart des HSHs du Sénégal a affirmé avoir des partenaires sexuelles féminines, ils peuvent servir de pont envers la population générale. Ceci pourrait être à l'origine de l'augmentation observée du sous-type C dans la population générale. Par conséquent, les programmes de prévention qui ciblent ces HSHs doivent aussi prendre en considération les pratiques hétérosexuelles de ces derniers, afin d'éviter la propagation d'épidémies à des populations plus larges.

The Origin and Evolutionary History of HIV-1 Subtype C in Senegal

Matthieu Jung^{1,2}, Nafissatou Leye^{1,3}, Nicole Vidal¹, Denis Fargette⁴, Halimatou Diop³, Coumba Toure Kane³, Olivier Gascuel^{2*}, Martine Peeters^{1*}

1 UMI233, TransVIHMI, IRD (Institut de Recherche pour le Développement) and University of Montpellier 1, Montpellier, France, **2** UMR 5506, Méthodes et Algorithmes pour la Bioinformatique, Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier, CNRS and University of Montpellier 2, Montpellier, France, **3** Laboratory of Bacteriology and Virology, Le Dantec University Teaching Hospital, Dakar, Senegal, **4** UMR RPB, Institut de Recherche pour le Développement, La Recherche Agronomique pour le Développement and University of Montpellier 2, Montpellier, France

Abstract

Background: The classification of HIV-1 strains in subtypes and Circulating Recombinant Forms (CRFs) has helped in tracking the course of the HIV pandemic. In Senegal, which is located at the tip of West Africa, CRF02_AG predominates in the general population and Female Sex Workers (FSWs). In contrast, 40% of Men having Sex with Men (MSM) in Senegal are infected with subtype C. In this study we analyzed the geographical origins and introduction dates of HIV-1 C in Senegal in order to better understand the evolutionary history of this subtype, which predominates today in the MSM population

Methodology/Principal Findings: We used a combination of phylogenetic analyses and a Bayesian coalescent-based approach, to study the phylogenetic relationships in *pol* of 56 subtype C isolates from Senegal with 3,025 subtype C strains that were sampled worldwide. Our analysis shows a significantly well supported cluster which contains all subtype C strains that circulate among MSM in Senegal. The MSM cluster and other strains from Senegal are widely dispersed among the different subclusters of African HIV-1 C strains, suggesting multiple introductions of subtype C in Senegal from many different southern and east African countries. More detailed analyses show that HIV-1 C strains from MSM are more closely related to those from southern Africa. The estimated date of the MRCA of subtype C in the MSM population in Senegal is estimated to be in the early 80's.

Conclusions/Significance: Our evolutionary reconstructions suggest that multiple subtype C viruses with a common ancestor originating in the early 1970s entered Senegal. There was only one efficient spread in the MSM population, which most likely resulted from a single introduction, underlining the importance of high-risk behavior in spread of viruses.

Citation: Jung M, Leye N, Vidal N, Fargette D, Diop H, et al. (2012) The Origin and Evolutionary History of HIV-1 Subtype C in Senegal. PLoS ONE 7(3): e33579. doi:10.1371/journal.pone.0033579

Editor: Chiyu Zhang, Jiangsu University, China

Received: September 26, 2011; **Accepted:** February 15, 2012; **Published:** March 28, 2012

Copyright: © 2012 Jung et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MJ was supported by a PhD grant from the Région Languedoc-Roussillon and from the University of Montpellier 2, France. Nafissatou Leye has a PhD grant from S.C.A.C. (Service de Coopération et d'Action Culturelle) of the French Embassy in Senegal. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: martine.peeters@ird.fr (MP); gascuel@lirmm.fr (OG)

Introduction

HIV-1 group M, which predominates in the global HIV/AIDS epidemic, can be further subdivided into subtypes (A–D, F–H, J, K), sub-subtypes (A1 to A4, F1 and F2), circulating recombinant forms (CRF01 to CRF51) and numerous unique recombinant forms (URFs) (www.hiv.lanl.gov). This genetic diversity has an impact on almost all aspects of the management of this infection going from identification and monitoring of infected persons, to treatment efficacy and vaccine design [1–3]. The classification of HIV strains has also helped in tracking the course of the HIV pandemic [4]. Numerous molecular epidemiological studies showed a heterogeneous geographic distribution of the different HIV-1 M subtypes and CRFs. The initial diversification of group M most likely occurred within or near the Democratic Republic of Congo (DRC) [5,6], where the highest diversity of group M strains has been observed and the earliest cases of HIV-1 infection (1959 and 1960) have been documented in Kinshasa, the capital city [7].

Different HIV variants have then spread across the world, and the epidemics in the different continents and countries are the result of different founder effects. Today, subtype C accounts for 50% of all infections [8]. The majority of subtype C infections are found in southern Africa where they represent almost 100% of circulating HIV-1 strains. Subtype C also predominates in India, Ethiopia and southern China, and has entered East Africa, Brazil, and many European countries. With increasing mobility and human migration, HIV-1 variants inevitably intermix in different parts of the world and the distribution of the different HIV-1 variants is a dynamic process.

In Senegal, which is located at the tip of West Africa, both AIDS viruses, HIV-1 and HIV-2, co-circulate. HIV-2 was first described in Senegal, but like in other West African countries, the prevalence of HIV-2 remained low and is decreasing [9,10]. Today HIV-1 predominates and since the description of the first HIV-1 AIDS case in 1986, HIV-1 seroprevalence remains below 1% in the general population but can reach up to 20% in

population groups with high risk behavior like female sex workers (FSWs) or men having sex with men (MSM) [11]. Several studies showed that CRF02_AG predominates in Senegal, representing 50–70% of circulating strains in the general population and FSWs, but in contrast to surrounding west African countries, a wide diversity of other HIV-1 variants co-circulate; subtypes A1, A3, B, D, F, G, H, CRF01, CRF06, CRF09, CRF11, CRF45 and HIV-1 group O have all been documented [10,12–14]. As mentioned above, the distribution of HIV-1 subtypes/CRFs can differ between geographic origins and between population groups. Recently our studies showed that 40% of MSM in Senegal are infected with subtype C, which is in strong contrast with 4% to 10% in the general population and FSWs [10,12–15]. The factors associated with the rapid spread of subtype C and its predominance in the global epidemic are not entirely known, but in certain regions where it has been introduced, subtype C has overtaken other HIV-1 variants [16]. The high prevalence and the rapid spread of subtype C among MSM needs thus particular attention because this could also lead to an increase overtime of subtype C in the general population because more than 90% of MSM recognize having sex with women [17].

Using a combination of phylogenetic analyses and a Bayesian coalescent-based approach, we studied the phylogenetic relationships of subtype C isolates from Senegal with other subtype C strains that were sampled worldwide, in order to define the origin and onset of the subtype C epidemic in MSM in Senegal.

Results

Origin of subtype C sequences in Senegal

Among the HIV-1 subtype C pol sequences that were downloaded, we first eliminated all sequences that were not identified as subtype C (i.e. intersubtype recombinants) by the REGA-subtyping tool and kept only one isolate per patient. The final dataset includes a total of 3,081 sequences spanning a 1,011 bp fragment in pol between positions 2,253 and 3,263 on the HXB2 genome, including 56 (among which 24 MSM and 18 newly sequenced) strains from Senegal (Table 1 and Table S1). Sequences were included from 4 different continents and 61 countries: Africa (22 countries), the Americas (7 countries), Asia (9 countries) and Europe (23 countries) (Table 2). The majority (67.73%) of the sequences are from Africa and more precisely from southern Africa (55.14%) that is South Africa (22.36%) and Zambia (20.55%), and to a lower extent Botswana (4.32%), Mozambique (3.18%), Malawi (2.30%), Swaziland (1.53%), and Zimbabwe (0.91%). Subtype C sequences from Asia are predominantly from India (355 sequences on a total of 380) and those from the Americas mainly from southern Brazil (253 sequences on a total of 299). Subtype C sequences from Europe represent 10.22% of the dataset and are collected from 23 different countries, without a single country or area that predominates in the dataset.

The maximum likelihood (PhyML) tree of the 3,081 subtype C sequences is shown in Figure 1. The strains from Senegal are highlighted in red, those from southern Africa (South Africa, Zambia, Zimbabwe, Malawi, Mozambique, Botswana, and Swaziland) in orange and those from the other African countries, which are predominantly from East Africa, in yellow. Strains from Asia, the Americas, and Europe are highlighted in green, purple and blue respectively. The sequences from Senegal are interspersed with the other African strains, but one significant cluster (98.9% aLRT support), which comprised all sequences obtained from MSM from Senegal, was identified. The phylogenetic tree shows also separate clades for subtype C strains from southern

Africa and one from eastern Africa (cluster B, 75.9% aLRT support), each of which contains sequences from Senegal. The tree shows the presence of two other major clusters, one for the majority of South American (cluster A, purple) and one for the Asian strains (cluster C, green), each apparently resulting from different single introductions, but no strain from Senegal was observed in these clusters. The clusters from South America and Asia are each supported by 72.7% and 82.3% aLRT values, respectively. No significant cluster of European subtype C was observed, they are all interspersed with strains from different geographic origins mainly in Africa and in Asia and southern America. In order to exclude the possibility of artifactual phylogenetic clustering due to drug induced convergent evolution, especially for the clades from Senegal, the phylogenetic tree analysis was repeated on an alignment where 43 (i.e. 129 nt, ~12.7% of the full alignment) codon positions known to be associated with major resistance mutations were removed. This analysis shows the same subtype C clusters (Figure S1).

The above analysis showed that subtype C was introduced into Senegal at multiple occasions. Figure 2 shows in more details the subtype C sequences that are most closely related to those observed in Senegal. As described in Materials and Methods, only sequences that branched with one or more sequences from Senegal until the second ancestral node in the phylogenetic tree of the 3,081 sequences, were used for this subtree. In addition to the 56 sequences from Senegal, 121 other subtype C sequences were included (Table S2), representing 5.7% of the total alignment. Figure 2 shows the tree obtained by PhyML with strains colored according to their geographic origin (the same tree with strain names is available in Figure S2). HIV-1 strains from Zambia are represented by a separate color in this tree because strains from this country are frequently present. The majority of the subtype C strains from Senegal and those from the MSM cluster (node C) are falling in clusters (aLRT >85%) which are mainly represented by strains from Zambia and other countries from southern Africa (for example node A, E and F). Nevertheless, some strains from Senegal are related to subtype C from east African countries (majority Ethiopia: node D). Although the exact country at the origin of the most recent common ancestor of the MSM strains remains uncertain, this was most likely in southern Africa. The first ancestral node to the MSM cluster (node B) suggests an origin in Zambia, but this node is only supported with 83.7% aLRT and 11% bootstrap values. The first ancestral node (node A), supported by an aLRT value of 94.7% and a bootstrap value of 49%, contains mainly strains from Zambia but also from other southern African countries. The Bayesian phylogenetic tree analysis performed with MrBayes shows similar results (Figure S3).

Dating the subtype C epidemic in Senegal and MSM population

We used a Bayesian MCMC approach implemented in BEASTv1.6.1 to estimate the dates of the most recent common ancestors (MRCAs) for the subtype C sequences from Senegal in the general population and for the subtype C epidemic in the MSM population. We used the Bayesian skyride population growth model associated to three molecular clock models: strict, relaxed uncorrelated lognormal, and relaxed uncorrelated exponential. Moreover, we used four different priors on the average substitution rate among branches with varying informative levels. Figure 3 shows the resulting estimations of the MRCA dates for the different models and priors used. More details are provided in Table S3, including substitution rate estimations.

Bayes factors (BF) indicate that the relaxed exponential model has a small advantage (BF in the 3 to 5 range) over the relaxed

Table 1. HIV-1 subtype C strains from Senegal included in this study.

Strain identification	Accession Number	Year of isolation	Population group	Reference
90SN-90SE364	AY713416	1990	general population	[53]
98SN-66HPD	AJ583722	1998	general population	[54]
99SN-159HALD	AJ583716	1999	general population	[54]
99SN-142HPD	AJ583715	1999	general population	[54]
98SN-39HALD	AJ287005	1998	general population	[55]
99SN-86HPD	AJ583739	1999	general population	[54]
04SN-MS003	FM210753	2004	MSM	[15]
04SN-MS883	FM210752	2004	MSM	[15]
04SN-MS855	FM210749	2004	MSM	[15]
04SN-MS835	FM210745	2004	MSM	[15]
04SN-MS821	FM210741	2004	MSM	[15]
04SN-MS816	FM210740	2004	MSM	[15]
04SN-MS779	FM210737	2004	MSM	[15]
04SN-MS700	FM210736	2004	MSM	[15]
04SN-MS540	FM210726	2004	MSM	[15]
04SN-MS522	FM210725	2004	MSM	[15]
04SN-MS492	FM210723	2004	MSM	[15]
04SN-MS048	FM210722	2004	MSM	[15]
04SN-MS481	FM210718	2004	MSM	[15]
04SN-MS477	FM210717	2004	MSM	[15]
04SN-MS475	FM210716	2004	MSM	[15]
04SN-MS448	FM210712	2004	MSM	[15]
04SN-MS422	FM210709	2004	MSM	[15]
04SN-MS245	FM210699	2004	MSM	[15]
04SN-MS029	FM210691	2004	MSM	[15]
04SN-MS015	FM210689	2004	MSM	[15]
04SN-MS011	FM210687	2004	MSM	[15]
04SN-MS010	FM210686	2004	MSM	[15]
04SN-MS007	FM210685	2004	MSM	[15]
04SN-MS002	FM210684	2004	MSM	[15]
03SN-980HALD	FN599776	2003	general population	[14]
03SN-965HALD	FN599773	2003	general population	[14]
02SN-510HALD	FN599737	2002	general population	[14]
99SN-67HDP	FN599718	1999	general population	[14]
09SN-SNA3-366	HM002544	2009	not known	unpublished
08SN-SNA3-220	HM002517	2008	not known	unpublished
08SN-SNA3-191	HM002515	2008	not known	unpublished
07SN-SNA3-107	HM002507	2007	not known	unpublished
02SN-260HALD	HE588158	2002	general population	this study
03SN-154HALD	HE588157	2003	general population	this study
03SN-321HALD	HE588156	2003	general population	this study
03SN-L065	HE588149	2003	general population	this study
06SN-463HALD	HE588155	2006	general population	this study
07SN-2658HALD	HE588150	2007	general population	this study
07SN-2909HALD	HE588151	2007	general population	this study
07SN-2911HALD	HE588152	2007	general population	this study
07SN-2936HALD	HE588153	2007	general population	this study
07SN-3076HALD	HE588154	2007	general population	this study
00SN-102HALD	HE588159	2000	general population	this study
97SN-1119	HE588162	1997	general population	this study

Table 1. Cont.

Strain identification	Accession Number	Year of isolation	Population group	Reference
02SN-478HALD	HE588163	2002	general population	this study
97SN-14Fann	HE588165	1997	general population	this study
97SN-25Fann	HE588164	1997	general population	this study
96SN-1083	HE588166	1996	general population	this study
97SN-1186	HE588161	1997	general population	this study
97SN-1189	HE588160	1997	general population	this study

doi:10.1371/journal.pone.0033579.t001

lognormal model, which in turn is slightly better (BF in the 3 to 6 range) than the strict molecular clock. However, the relaxed exponential model becomes non-informative when non- or poorly informative priors on the substitution rate are used ($U[0,1]$ and $N[2.5 \times 10^{-3}, 10 \times 10^{-4}]$, see Materials and Methods), which reveals spurious peaks leading to very large (up to ~ 400 years) 95% Highest Posterior Density (HPD) intervals and unrealistic estimates. Except in these two cases, the results with all models and priors are quite consistent. As expected, when we used more informative priors we obtained more restricted 95% HPD intervals. Nevertheless, the median date estimates of the MRCAs of subtype C in the general population of Senegal and for the MSM cluster are similar for all models and priors, indicating likely epidemic origins in the early 80's, in the MSM population. The MRCA for the subtype C strains that entered at multiple occasions into the general population (i.e. heterosexual or mother to child transmission), is estimated in the early 70's.

To illustrate in more detail the MRCA of the subtype C strains in the MSM population and their relation to the other HIV-1 C strains from Senegal, the maximum clade credibility (MCC) tree with time scale obtained from BEAST is shown in Figure 4. We see the same MSM cluster as in the phylogeny of Figure 2 (see also Figure S2 and S3), and the early 70's and 80's dates for the MRCAs of general and MSM population respectively.

We verified whether presence of drug resistance mutations could have an impact on MRCA dates and substitution rate estimations. Therefore calculations were repeated on the three different molecular clock models and for the four priors on an alignment where 43 codon positions known to be associated with major resistance mutations were removed. This analysis showed no significant difference, compared to the results obtained with the complete alignment (Table S3 for details on estimations and Figure S4 for the MCC tree with time scale).

Finally, our reconstruction of the demographic history of HIV-1 C in Senegal identified an initial, slow growth phase until the end of the 70's followed by a period of quick exponential-like growth at the end of the 90's where the epidemic growth became slower (Figure 5).

Discussion

In this study we analyzed the geographical origins and introduction dates of HIV-1 subtype C in Senegal in order to better understand the evolutionary history of this subtype which predominates today in the MSM population [15]. Our evolutionary reconstructions suggest that multiple subtype C viruses with a common ancestor originating in the early 1970s entered the country, followed by a sharp growth of the effective number of infections over the next decade.

This analysis of more than 3,000 globally collected reference sequences most likely provides an adequate representation of global subtype C diversity, and provides also additional information on the subtype C epidemic in other continents. The phylogenetic tree analysis showed several major clusters of subtype C sequences, mainly related to the continent of origin, like Asia, Southern America or Africa, except for Europe. Interestingly, among the African strains, a separate cluster of strains derived from patients living in east African countries was observed [18], and subtype C strains from Europe do not form a separate cluster and are interspersed among the different continents and major clusters. Our data also confirm the previously reported link of the subtype C epidemic in Brazil with east Africa [19–22].

Our analyses with various methods (PhyML, MrBayes and BEAST) showed a significantly well-supported cluster which contained all subtype C strains that circulate among MSM in Senegal. The MSM cluster and other strains from Senegal are widely dispersed among the different subclusters of African strains, suggesting multiple introductions of subtype C into Senegal from many different southern and also eastern African countries. More detailed analyses showed that the majority of the HIV-1 C strains from Senegal, including those circulating among MSM, are more closely related to strains from southern African countries, mainly Zambia. The cluster of subtype C strains derived from the MSM population includes also strains from HIV-1 infected men from Senegal, who were not identified as MSM. Homosexuality is illegal in Senegal and male-to-male sex is condemned by political and religious authorities and by the general population, therefore most MSM keep their sexual life secret, including from their own family and more than 90% of MSM reported having sex also with women [17]. Thus, these additional strains in the MSM cluster are most likely from individuals with male-to-male sex activities. Subtype C in MSM may have its origin directly from southern Africa but it is also possible that the ancestor of this subtype C cluster circulated already for a certain period in the general population in Senegal before it was introduced into the MSM group.

The wide diversity and multiple introductions of subtype C fit also with the distribution of the HIV-1 variants in the general population in Senegal. Several studies showed that in addition to CRF02_AG, many other HIV-1 subtypes and CRFs are also present in the country, reflecting multiple introductions [10,12–14]. This is most likely related to the important trading activity and travel links of the country with many other African countries [23,24]. Our estimates suggest that the MRCA of the subtype C strains that entered Senegal was in the early 1970's, about 10–15 years before the description of the first HIV-1 AIDS case in the country or the first HIV-1 subtype C strain in 1988 in Senegal [25]. The MRCA date estimate of subtype C in Senegal is

Table 2. Numbers of HIV-1 subtype C strains from different countries that were included in this study.

Continent	Country	Number	%
Africa		2087	67.73
	Botswana	133	4.32
	Burundi	91	2.95
	Democratic Republic of Congo	19	0.62
	Djibouti	1	0.03
	Equatorial Guinea	1	0.03
	Eritrea	2	0.06
	Ethiopia	99	3.21
	Gabon	1	0.03
	Kenya	4	0.13
	Malawi	71	2.30
	Mali	1	0.03
	Mozambique	98	3.18
	Niger	4	0.13
	Senegal	56	1.82
	Somalia	1	0.03
	South Africa	689	22.36
	Sudan	10	0.32
	Swaziland	47	1.53
	Tanzania	82	2.66
	Uganda	16	0.52
	Zambia	633	20.55
	Zimbabwe	28	0.91
America		299	9.71
	Argentina	8	0.26
	Brazil	253	8.21
	Cuba	25	0.81
	Honduras	1	0.03
	United States of America	9	0.29
	Uruguay	2	0.06
	Venezuela	1	0.03
Asia		380	12.33
	China	7	0.23
	India	355	11.52
	Israel	5	0.16
	Myanmar	1	0.03
	Philippines	1	0.03
	Russia	1	0.03
	South Korea	2	0.06
	Taiwan	1	0.03
	Yemen	7	0.23
Europe		315	10.22
	Austria	3	0.10
	Belgium	35	1.14
	Cyprus	8	0.26
	Czech Republic	11	0.36
	Danmark	21	0.68
	Finland	6	0.19

Table 2. Cont.

Continent	Country	Number	%
	France	7	0.23
	Georgia	1	0.03
	Germany	7	0.23
	Greece	3	0.10
	Italy	22	0.71
	Luxemburg	3	0.10
	Norway	16	0.52
	Poland	2	0.06
	Portugal	28	0.91
	Roumania	35	1.14
	Slovakia	1	0.03
	Spain	26	0.84
	Sweden	64	2.08
	Switzerland	2	0.06
	The Netherlands	8	0.26
	Ukraine	3	0.10
	United Kingdom	3	0.10
Total		3081	

doi:10.1371/journal.pone.0033579.t002

relatively close to those estimated in other African countries, like 1966 for subtype C in Ethiopia [26], beginning of the 70's for Zimbabwe [27] or in the late 60's for Malawi [28]. As expected, we found that MRCA of subtype C in Senegal is not specific, because multiple introductions occurred, and our MRCA date estimate corresponds most likely to those of subtype C strains outside Senegal. In contrast to southern African countries, subtype C did not become the predominant strain in Senegal and did only spread efficiently in the MSM population, underlining the importance of high risk behavior in spread of viruses [29]. The MRCA of subtype C in the MSM population is estimated in the early 80's and is the result of a single introduction. This estimate coincides with the period where the HIV-1 C epidemic started a quick exponential-like growth phase in Senegal for nearly 15 years according to the Bayesian skyline analysis.

Our study showed also that analysis of alignments with or without codons that are associated with drug resistance did not have a significant impact on phylogenetic clustering or on MRCA date and substitution rate estimations. Among the different molecular clock models used, Bayes factors suggested the use of the relaxed exponential molecular clock above the most frequently used relaxed lognormal molecular clock. However, the very large confidence intervals and convergence problems with the exponential model with poorly informative priors, and the almost similar results with informative priors for both models are probably at the basis for the preferential use of the relaxed lognormal molecular clock model for HIV.

Previous studies suggest that subtype C could spread more efficiently due to the predominance of CCR5 variants or a stronger predisposition for localization in the female genital mucosa than other subtypes, which may facilitate both vertical and heterosexual transmission [30–33]. Increase of subtype C could also have implications on treatment because other subtype C specific mutations have been documented and commercial drug resistance assays cannot correctly test subtype C infections [2,34–

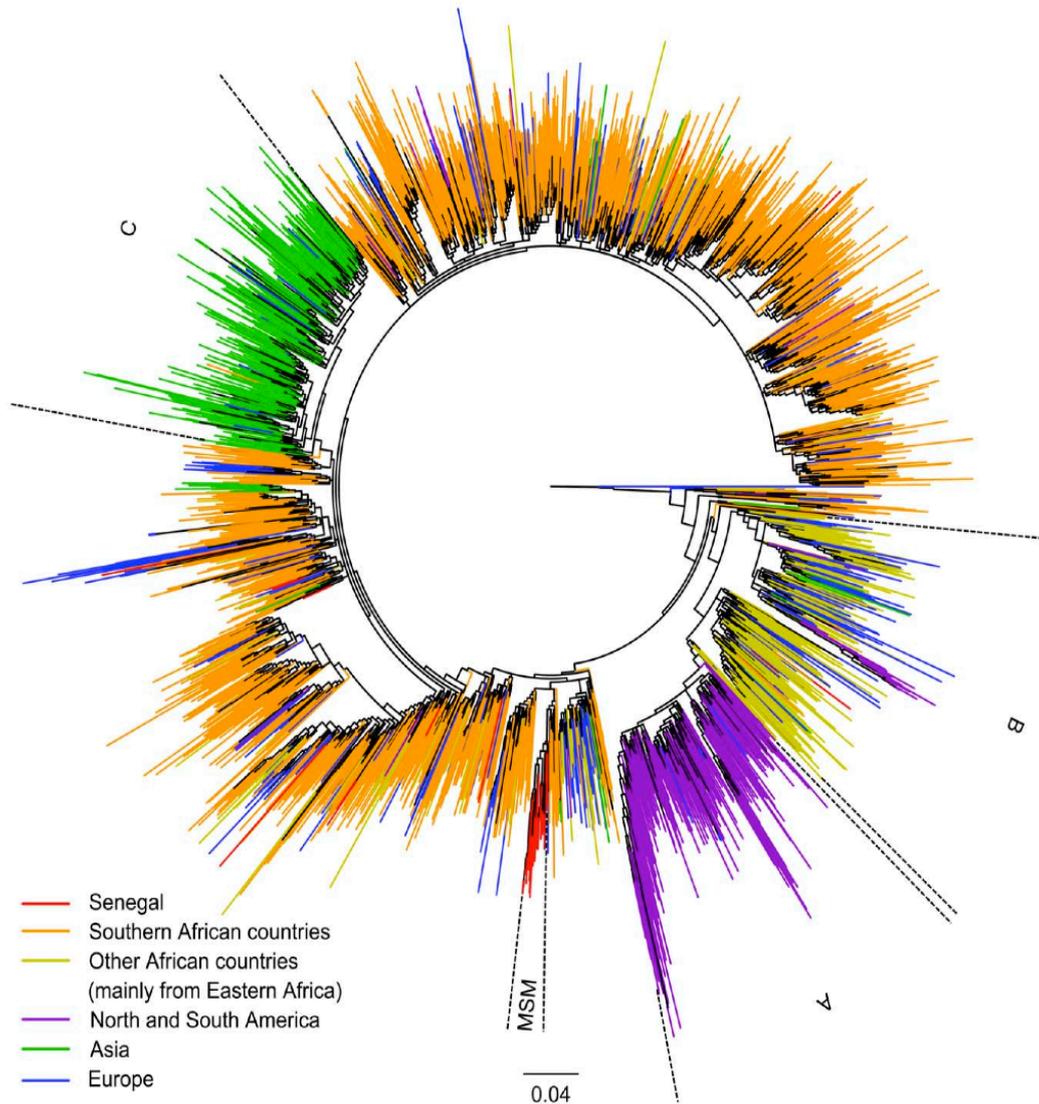


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic tree based on 3,081 HIV-1 subtype C *pol* sequences. Maximum likelihood (PhyML) phylogenetic tree based on 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequence (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 3,081 HIV-1 subtype C isolates. Sequences were isolated in the countries shown in Table 2. Sequences are colored to their region of origin: Senegal in red, Southern African countries (South-Africa, Botswana, Malawi, Mozambique, Swaziland, Zambia and Zimbabwe) in orange, other African countries (mainly from the East) in yellow, North and South America in purple, Asia in green and Europe in blue. The branch support (aLRT) of clade A, B, C and MSM are of 73%, 76%, 82% and 99% respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0033579.g001

36]. A cross-sectional study of women in Kenya indicated that women infected with subtype C had a higher viral load and lower CD4 counts than those infected with subtypes A and D, which could also have an impact on pathogenesis and transmission [37]. Therefore, it is important to continue to monitor HIV-1 subtype/CRF distribution among different population groups in Senegal. However, in order to be able to compare trends over time, such studies should be organized in a standardized way. For example, WHO proposed standardized protocols for surveillance of drug resistance mutations in recently infected individuals [38]. These studies can be combined with subtype/CRF characterization.

Because MSM reported having sex also with women, they could potentially serve as a bridge between high-risk men and low-risk women. This sexual mixing pattern might contribute in the future to the subsequent increase of subtype C in the general population. An increase from 4% in 2000 to almost 10% between 2000 and 2010 among the general population in Senegal has already been observed, and subtype C sequences recently obtained from HIV-1 C infected women in 2011 that cluster within the clade of strains from the MSM population have now been observed (Coumba Toure Kane, unpublished results). Understanding the origins and dispersal patterns of HIV-1 clades at regional and country levels is

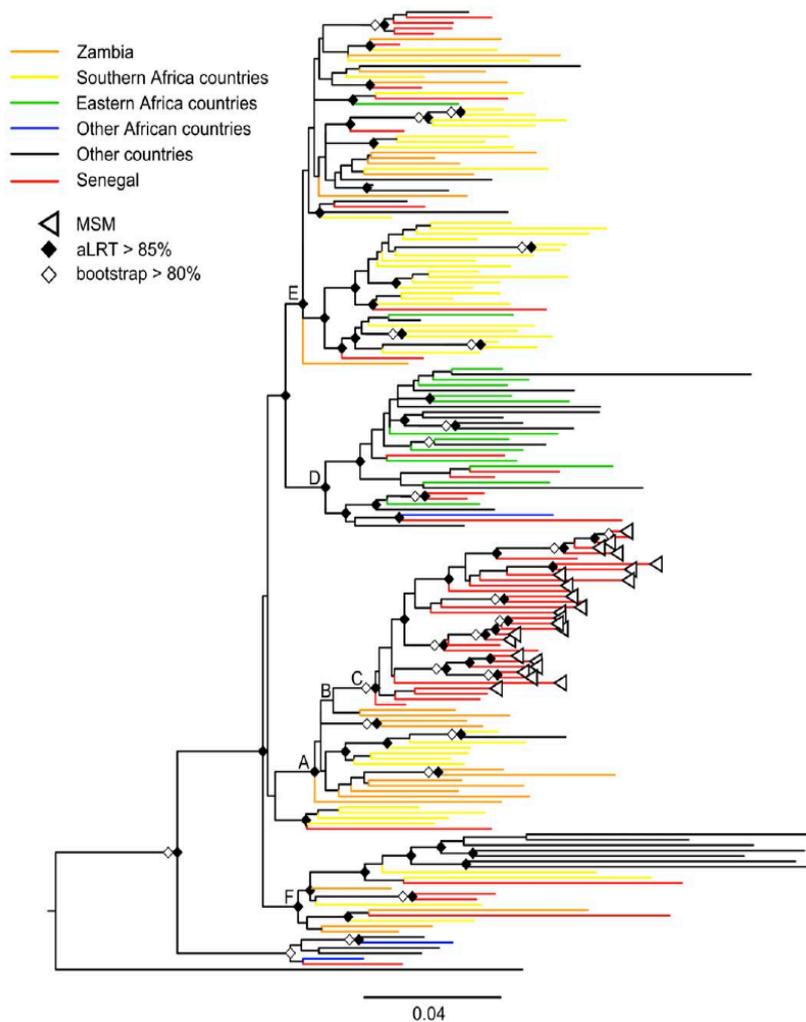


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree constructed from 56 HIV-1 C *pol* sequences from Senegal and 121 close relatives. Detailed maximum likelihood (PhyML) phylogenetic tree constructed using 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequence (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 177 HIV-1 subtype C isolates from Senegal and close relatives (see text). Branch support values (bootstrap and aLRT) are displayed (see figure legend). Colors indicate the geographic origin and sequences were isolated in the following countries: 56 in red from Senegal, 25 in orange from Zambia, 49 in yellow from southern Africa (Botswana 6; Mozambique 5; Swaziland 2; South Africa 35; Zimbabwe 1), 12 in green from East Africa (Burundi 2; Ethiopia 9; Kenya 1; Sudan 2), 3 in blue from other African countries (DRC 1; Equatorial Guinea 1; Gabon 1) and 30 in black from European and Asian countries (Belgium 4; China 1; Germany 2; Denmark 1; Spain 5; France 1; Greece 1; Israel 1; India 1; Italia 1; Luxembourg 1; Norway 2; Portugal 2; Sweden 7). doi:10.1371/journal.pone.0033579.g002

useful to improve the characterization and control of HIV spread. Continuous monitoring of HIV variants seems necessary to adapt treatment and vaccine strategies to be efficient against local and contemporary circulating HIV variants.

Materials and Methods

Nucleotide sequence dataset

In order to increase the number of sequences and to cover a wide geographic range, we used the *pol* region for our analysis. *Pol* sequences are highly studied because they are the target of antiretroviral drugs. A total of 56 subtype C *pol* gene sequences from Senegal were used in this study. Thirty-eight were obtained

from the Los Alamos HIV sequence database (www.hiv.lanl.gov) from previously published reports and eighteen were newly characterized from ongoing molecular epidemiology and/or drug resistance studies mainly in Dakar, the capital city of Senegal (Table 1). We downloaded only sequences that were at least 1,000 nucleotides in length and spanning the genomic region which covers protease and majority of RT in *pol* between positions 2,253–3,263 on the HXB2 genome. Sequences were from blood samples collected between 1990 and 2009. In addition, all available subtype C sequences spanning the same genomic region and for which country of origin and sampling year were known, were also downloaded from the Los Alamos HIV database (www.hiv.lanl.gov). We then submitted all the sequences to the REGA

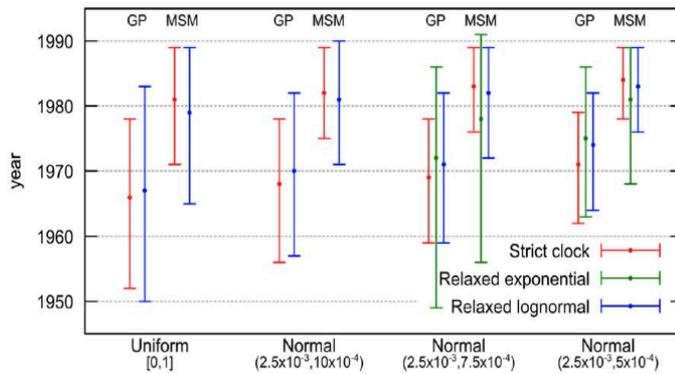


Figure 3. Dating the subtype C epidemic in general and MSM populations in Senegal. Coalescent based estimations (BEAST) and 95% highest posterior density (HPD) intervals of the MRCA dates of 56 HIV-1 subtype C *pol* sequences obtained from the general and the MSM population. Results are displayed for all tested substitution rate priors and molecular clock models, except for relaxed exponential with both less informative priors which provides very large 95% HPD intervals and shows convergence problems (see Table S3 for detailed results, including substitution rate estimations).

doi:10.1371/journal.pone.0033579.g003

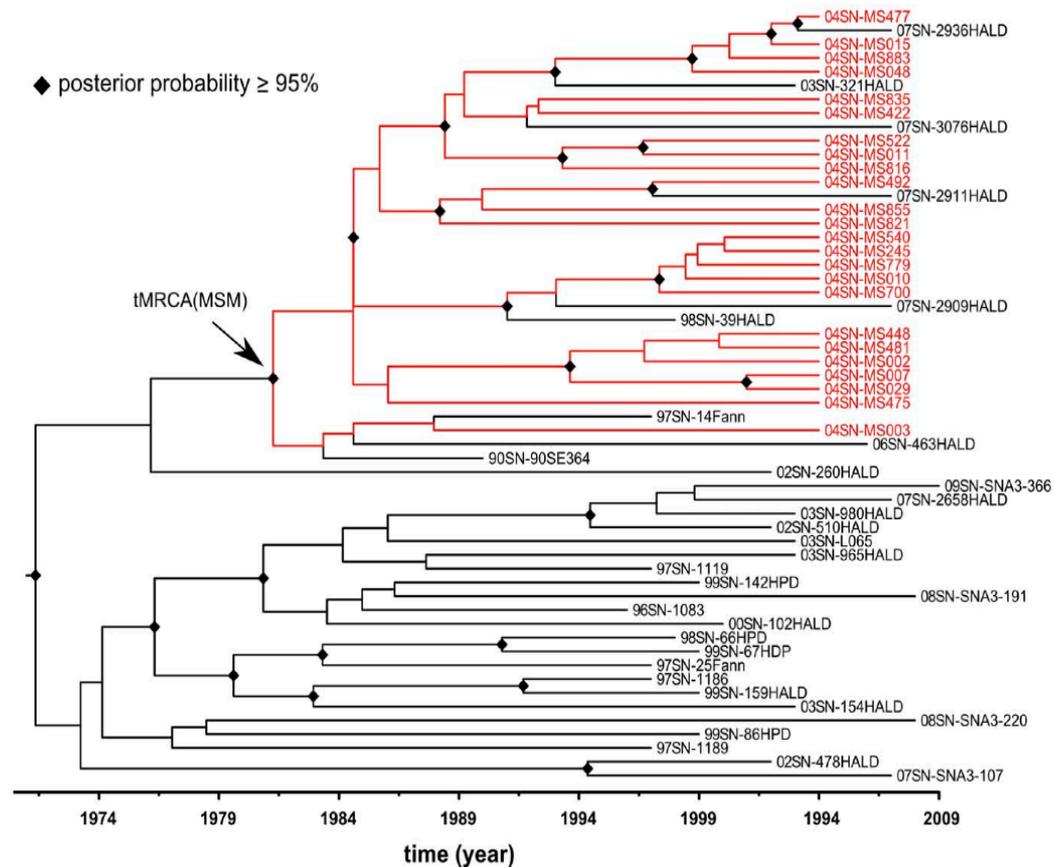


Figure 4. Bayesian tree with timescale of 56 HIV-1 C *pol* sequences from Senegal. Maximum clade credibility tree with time scale obtained with BEAST using 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequences (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 56 HIV-1 subtype C isolates from Senegal. This tree is obtained using the relaxed uncorrelated lognormal molecular clock model and moderately informative substitution rate prior (Normal: 2.5×10^{-3} , 7.5×10^{-4}). Clades with posterior probabilities $\geq 95\%$ are indicated by diamonds. MSM isolates are colored in red.

doi:10.1371/journal.pone.0033579.g004

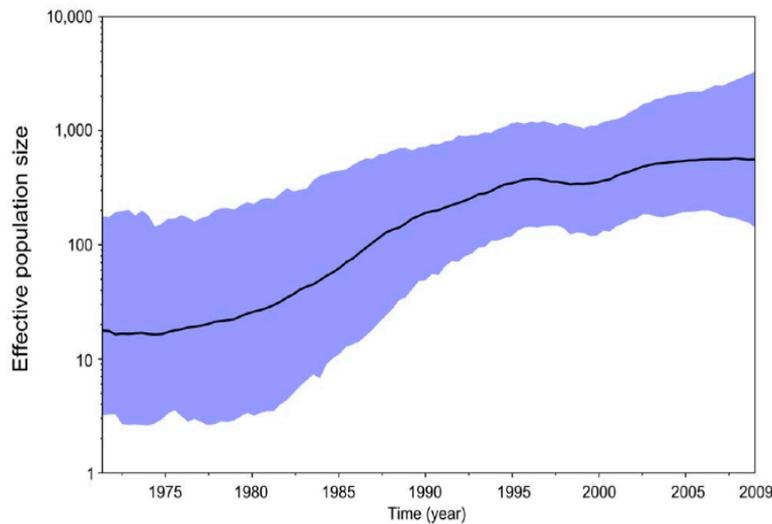


Figure 5. Bayesian skyride plot of HIV-1 C demographic growth in Senegal using 56 *pol* sequences. Estimates of HIV-1 C effective number of infections (N_e) over time from 56 Senegalese *pol* sequences using a Bayesian skyride plot in BEAST with relaxed uncorrelated lognormal molecular clock and moderately informative substitution rate prior (uclid.mean Normal: 2.5×10^{-3} , 7.5×10^{-4}). The X-axis represents the time in year. The Y-axis represents the HIV-1 effective number of infections (\log_{10} scale). The black line marks the median estimate for N_e and the blue shadow region displays the 95% highest posterior density (HPD) interval.
doi:10.1371/journal.pone.0033579.g005

subtyping tool v.2 to confirm subtype assignments and to eliminate eventual intersubtype recombinants [39,40]. We selected one sequence per individual when sequential sequences were available or when sequences were epidemiologically linked by direct donor–recipient transmission.

HIV-1 *pol* sequencing

The 18 new HIV-1 *pol* sequences were obtained with an in-house technique as previously described [41]. Briefly, RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA extraction kit (Qiagen SA, Courtabeuf, France) and processed for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the integrase specific primer IN3 5'-TCTATBCCATCTAAAAATAGTACTTTCCTGATTCC-3' using the Expand reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA served as template in the subsequent nested PCR reaction during which a 1,865 base pairs fragment, corresponding to the protease and the first 440 amino acids of the reverse transcriptase region of the *pol* gene, was amplified with previously described primers and cycling conditions using the Expand Long Template PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The amplified HIV-1 nucleic acid fragments were purified using the GeneClean Turbo Kit (Q-Biogen, MPBiomedicals, France) and directly sequenced with primers encompassing the *pol* region using BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Courtabeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Electrophoresis and data collection were done on an Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer. The sequenced fragments from both strands were reconstituted using Seqman II from the DNASTar package v5.08 (Lasergene, Madison, WI, USA).

Sequence alignment and phylogenetic tree analysis

The 18 newly obtained sequences were aligned with the alignment of subtype C sequences downloaded from the Los

Alamos HIV database, using the L-INS-i method from MAFFT [42,43], and then manually edited with MEGA5 [44]. The HXB2 subtype B prototype strain was used as outgroup. In order to study potential bias due to drug-induced convergent evolution, all our analysis were also repeated on an alignment for which we removed 43 codon positions known to be associated with major resistance mutations according to the WHO-list of 2009 [45]. The following positions were excluded for protease (23, 24, 30, 32, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 73, 76, 82, 83, 84, 85, 88, 90) and RT (41, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 77, 100, 101, 103, 106, 115, 116, 151, 179, 181, 184, 188, 190, 210, 215, 219, 225, 230), leaving 882 nt in the final alignment. Both complete (1,011 nt) and restricted (882 nt) sequence alignments are available from the authors upon request. Maximum Likelihood phylogenies were inferred using the GTR+I+ Γ 4 nucleotide substitution model recommended by [46] and implemented in PhyML v3.0 [47]. The SPR option was selected to search the tree space and aLRT SH-like branch supports were used to assess confidence in topology [48]. The phylogenetic tree was drawn with FIGTREE (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

In order to better determine and visualize the relationship of the subtype C sequences from Senegal to those from other geographic areas, another phylogenetic analysis was performed with less sequences. For this subtree, we collected from the large, previous phylogenetic tree, all descendant sequences of nodes that are first or second level ancestor of at least one sequence from Senegal (i.e., all Senegalese sequences plus their sisters and close relatives). A phylogeny was then inferred, using the same method and options as described above, but in addition to aLRT we ran a non-parametric bootstrap with 100 replicates to obtain a second assessment of branch supports. A phylogenetic analysis on this subset of sequences was also inferred using MrBayes v3.1 [49] with the same substitution model as for the maximum likelihood tree, and with chain length and tree sampling frequency of 5×10^7 and 1×10^4 generations, respectively. A burn-in of 2,000 sampled trees (i.e. $\sim 40\%$) was selected. By the end of the run, the average

standard deviation of split frequencies was below 0.01 and the potential scale reduction factor of every parameter was in the range [0.999, 1.001], except the parameter pinvar which is at 1.002, proving the convergence of the Markov chains (see MrBayes manual).

Dating the introduction of subtype C in Senegal and MSM population

Estimates of the substitution rate and dates of the most recent common ancestor (MRCA) of subtype C in Senegal and in the sub-epidemic in MSM were obtained using BEAST v1.6.1 [50]. The 56 *pol* gene subtype C sequences from Senegal were analyzed under a GTR+I+Γ4 substitution process (as for phylogenetic analyses). We used three different molecular clock models (strict clock, relaxed uncorrelated exponential and relaxed uncorrelated lognormal) [51] as implemented in BEAST with a Bayesian skyride tree prior as a coalescent demographic model with time-aware smoothing [52]. For the parameters of each molecular clock model (ucl.d.mean, uced.mean and clock.rate for the relaxed lognormal, relaxed exponential and strict molecular clock respectively) we tested a total of four different priors, one non-informative prior based on a uniform distribution (between 0.0 and 1.0) and three priors with varying information levels based on normal distribution with a mean of 2.5×10^{-3} (based on estimations from a previous study [27] in the same genomic region and as estimated by Path-O-Gen: tree.bio.ed.ac.uk/software/pathogen/) and standard deviations of 10×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , and 5.0×10^{-4} , respectively. For the ucl.d.stdev parameter (representing the variability of the rates among branches for the relaxed lognormal molecular clock) we used a prior based on an exponential distribution with mean of 0.1 (personal communication with A. Drummond). MCMC simulations were run for 2.5×10^8 chain steps with sub-sampling every 2.5×10^5 steps. Convergence of the chains was inspected using Tracer v1.5. For each tested prior and for each parameter, effective sample size (ESS) values were always above 300. The Bayes Factor was calculated to compare molecular clock models, using marginal likelihood as implemented in Tracer v1.5. The Maximum Clade Credibility with time scale (MCC) tree was obtained by TreeAnnotator v1.6.1 with a burn-in of the first hundred trees.

Supporting Information

Figure S1 Maximum likelihood phylogenetic tree based on 3,081 HIV-1 subtype C *pol* sequences, without codons associated to drug resistance in PR and RT. Maximum likelihood phylogenetic tree (PhyML, with the same options as for the tree in Figure 1) based on 882 nucleotide sites of *pol* gene sequence from 3,081 HIV-1 subtype C isolates; nucleotide sites with coordinates 2,253–3,263 of HXB2 are included, but codon positions known to be associated with major resistance mutations according to the WHO-list of 2009 were removed (see Materials and Methods). Sequences were isolated in the countries shown in Table 2. Sequences are colored according to their region of origin: Senegal in red, Southern African countries (South-Africa, Botswana, Malawi, Mozambique, Swaziland, Zambia and Zimbabwe) in orange, other African countries (mainly from the East) in yellow, North and South America in purple, Asia in green and Europe in blue. The branch support (aLRT) of clades A, B, C and MSM are respectively of 94%, 92%, 83% and 96%. (JPG)

Figure S2 Maximum likelihood phylogenetic tree constructed of 56 HIV-1 C *pol* sequences from Senegal and

121 close relatives. Detailed maximum likelihood (PhyML) phylogenetic tree constructed using 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequence (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 177 HIV-1 subtype C isolates from Senegal and close relatives (see Materials and Methods) as shown in Figure 2 but names of the strains are added. Branch support values (bootstrap and aLRT) are displayed (see figure legend). Colors indicate the geographic origin and sequences were isolated in the following countries: 56 in red from Senegal, 25 in orange from Zambia, 49 in yellow from southern Africa (Botswana 6; Mozambique 5; Swaziland 2; South Africa 35; Zimbabwe 1), 12 in green from East Africa (Burundi 2; Ethiopia 9; Kenya 1; Sudan 2), 3 in blue from other African countries (DRC 1; Equatorial Guinea 1; Gabon 1) and 30 in black from European and Asian countries (Belgium 4; China 1; Germany 2; Denmark 1; Spain 5; France 1; Greece 1; Israel 1; India 1; Italia 1; Luxembourg 1; Norway 2; Portugal 2; Sweden 7). (TIFF)

Figure S3 Bayesian phylogenetic tree of 56 HIV-1 C *pol* sequences from Senegal and 121 close relatives. Detailed Bayesian phylogenetic tree (MrBayes, same model and similar options as for the tree in Figure 2, see Materials and Methods) constructed using 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequence (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 177 HIV-1 subtype C isolates from Senegal and close relatives. Clades with posterior probabilities $\geq 95\%$ are shown. Colors indicate the geographic origin of the sequences, which were isolated in the following countries: 56 in red from Senegal, 25 in orange from Zambia, 49 in yellow from southern Africa (Botswana 6; Mozambique 5; Swaziland 2; South Africa 35; Zimbabwe 1), 12 in green from East Africa (Burundi 2; Ethiopia 9; Kenya 1; Sudan 2), 3 in blue from other African countries (DRC 1; Equatorial Guinea 1; Gabon 1) and 30 in black from European and Asian countries (Belgium 4; China 1; Germany 2; Denmark 1; Spain 5; France 1; Greece 1; Israel 1; India 1; Italia 1; Luxembourg 1; Norway 2; Portugal 2; Sweden 7). (TIFF)

Figure S4 Bayesian tree with timescale of 56 HIV-1 C *pol* sequences from Senegal, without sites associated to major, known resistance in PR and RT. Maximum clade credibility tree with time scale obtained with BEAST using 1,011 nucleotide sites of *pol* gene sequences (nucleotides 2,253–3,263 of HXB2 coordinates) from 56 HIV-1 subtype C isolates from Senegal. This tree is obtained using the relaxed uncorrelated lognormal molecular clock model and moderately informative substitution rate prior (Normal: 2.5×10^{-3} , 7.5×10^{-4}). Clades with posterior probabilities $\geq 95\%$ are indicated by diamonds. MSM isolates are colored in red. (TIFF)

Table S1 Genbank accession numbers per country of subtype C HIV-1 strains included in the study. (DOC)

Table S2 Details of the strains included in the restricted phylogenetic tree analysis from Figures 2, S2 and S3. (PDF)

Table S3 Dating the subtype C epidemic in general and MSM populations in Senegal. Coalescent based estimations (BEAST) and 95% highest posterior density (HPD) intervals of the MRCA dates and substitution rates of 56 HIV-1 subtype C *pol* sequences obtained from the general and the MSM population. Results are displayed for all tested substitution rate priors and molecular clock models. (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MP OG. Performed the experiments: MJ NL NV. Analyzed the data: MJ NL NV DF HD CTK OG MP. Contributed reagents/materials/analysis tools: HD CTK. Wrote the paper: MJ DF OG MP.

References

- Thomson MM, Pérez-Alvarez L, Nájera R (2002) Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2: 461–71. Review.
- Peeters M, Aghokeng AF, Delaporte E (2010) Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin Microbiol Infect* 16: 1525–31. Review.
- Gamble IJ, Matthews QL (2010) Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des Devel Ther* 5: 9–26. Review.
- Tebit DM, Arts EJ (2011) Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 11: 45–56. Review.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, et al. (2000) Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 74: 10498–507.
- Rambaut A, Robertson DL, Pybus OG, Peeters M, Holmes EC (2001) Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* 410: 1047–8.
- Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, et al. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455: 661–4.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25: 679–89.
- Barin F, M'Boup S, Denis F, Kanki P, Allan JS, et al. (1985) Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 2: 1387–9.
- Hamel DJ, Sankalé JL, Eisen G, Meloni ST, Mullins C, et al. (2007) Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 1189–96.
- UNAIDS website. Available: www.unaids.org/en/regionscountries/countries/senegal/. Accessed 2011 Aug 23.
- Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, et al. (2000) Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 603–9.
- Ayoub A, Lien TT, Nounin J, Vergne L, Aghokeng AF, et al. (2009) Low prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in untreated, recently infected patients from Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Senegal, Thailand, and Vietnam: the ANRS 12134 study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 1193–6.
- Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Leye N, Ngom-Gueye NF, Montavon C, et al. (2010) Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naïve patients from Senegal. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 1133–8.
- Ndiaye HD, Toure-Kane C, Vidal N, Niama FR, Niang-Diallo PA, et al. (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: 249–52.
- Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, et al. (2005) HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 19: Suppl 4S81–86.
- Wade AS, Kane CT, Diallo PAN, Diop AK, Gueye K, et al. (2005) HIV infection and sexually transmitted infections among men who have sex with men in Senegal. *AIDS* 19: 2133–2140.
- Thomson MM, Fernández-García A (2011) Phylogenetic structure in African HIV-1 subtype C revealed by selective sequential pruning. *Virology* 415: 30–8.
- Fontella R, Soares MA, Schrago CG (2008) On the origin of HIV-1 subtype C in South America. *AIDS* 22: 2001–11.
- Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, et al. (2008) Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 22: 1993–2000.
- de Oliveira T, Pillay D, Gifford RJ, UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance (2010) The HIV-1 subtype C epidemic in South America is linked to the United Kingdom. *PLoS One* 5(2): e9311.
- Véras NM, Gray RR, Brígido LF, Rodrigues R, Salemi M (2011) High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. *J Gen Virol* 92: 1698–709.
- Kane F, Alary M, Ndiaye I, Coll AM, M'boup S, et al. (1993) Temporary expatriation is related to HIV-1 infection in rural Senegal. *AIDS* 9: 1261–5.
- Kanki PJ, Peeters M, Gueye-Ndiaye A (1997) Virology of HIV-1 and HIV-2: implications for Africa. *AIDS* 11 Suppl B: S33–4.
- Kanki PJ, Hamel DJ, Sankalé JL, Hsieh C, Thior I, et al. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 179: 68–73.
- Tully DC, Wood C (2010) Chronology and evolution of the HIV-1 subtype C epidemic in Ethiopia. *AIDS* 24: 1577–82.
- Dalai SC, de Oliveira T, Harkins GW, Kassaye SG, Lint J, et al. (2009) Evolution and molecular epidemiology of subtype C HIV-1 in Zimbabwe. *AIDS* 23: 2523–32.
- Travers SA, Clewley JP, Glynn JR, Fine PE, Crampin AC, et al. (2004) Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 78: 10501–6.
- McDaid LM, Hart GJ (2010) Sexual risk behaviour for transmission of HIV in men who have sex with men: recent findings and potential interventions. *Curr Opin HIV AIDS* 5: 311–5. Review.
- Abraha A, Nankya IL, Gibson R, Demers K, Tebit DM, et al. (2009) CCR5- and CXCR4-tropic subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates have a lower level of pathogenic fitness than other dominant group M subtypes: implications for the epidemic. *J Virol* 83: 5592–5605.
- Ball SC, Abraha A, Collins KR, Marozsan AJ, Baird H, et al. (2003) Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol* 77: 1021–38.
- Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, et al. (2004) Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 18: 1629–1636.
- John-Stewart GC, Nduati RW, Rousseau CM, Mbori-Ngacha DA, Richardson BA, et al. (2005) Subtype C is associated with increased vaginal shedding of HIV-1. *J Infect Dis* 192: 492–496.
- Martínez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA (2009) Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: A systematic review of evidence (1996–2008). *J Int AIDS Soc* 12: 11.
- Vergne L, Snoeck J, Aghokeng A, Maes B, Valca D, et al. (2006) Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naïve and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 53–62.
- Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, et al. (2006) Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 694–701.
- Neilson JR, John GC, Carr JK, Lewis P, Kreiss JK, et al. (1999) Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol* 73: 4393–4403.
- Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF (2008) The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 1–13.
- de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, et al. (2005) An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 21: 3797–800.
- Alcantara LC, Cassol S, Libin P, Deforche K, Pybus OG, et al. (2009) Standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Res* 37: 634–42.
- Vergne L, Diabougou S, Kouanfack C, Aghokeng A, Butel C, et al. (2006) HIV-1 drug-resistance mutations among newly diagnosed patients before scaling-up programmes in Burkina Faso and Cameroon. *Antivir Ther* 11: 575–9.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30: 3059–3066.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33: 511–8.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–9.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. e4724 p.
- Posada D, Crandall KA (2001) Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol* 18: 897–906.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–21.
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539–52.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4: e88.

52. Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA (2008) Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol Biol Evol* 25: 1459–71.
53. Brown BK, Darden JM, Tovanabutra S, Oblander T, Frost J, et al. (2005) Biologic and genetic characterization of a panel of 60 human immunodeficiency virus type 1 isolates, representing clades A, B, C, D, CRF01_AE, and CRF02_AG, for the development and assessment of candidate vaccines. *J Virol* 79: 6089–101.
54. Vergne L, Kane CT, Laurent C, Diakhaté N, Guéye NF, et al. (2003) Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS* 17 Suppl 3: S31–8.
55. Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, et al. (2000) Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol* 38: 3919–25.

Discussion générale

Ces travaux de thèse ont porté sur quatre objectifs distincts et complémentaires les uns des autres et qui contribuent à l'amélioration des connaissances sur l'efficacité du traitement ARV dans les pays du sud et plus particulièrement au Sénégal, ainsi que sur la grande diversité génétique du VIH dans le pays et particulièrement chez les HSHs.

Pour mieux évaluer l'efficacité du traitement ARV, l'émergence de nouveaux recombinaux du VIH-1 et le risque d'éventuelles transmissions de souches entre groupes à risque et population générale, il était nécessaire d'évaluer les résistances transmises aux patients naïfs de traitement ARV, de documenter l'efficacité virologique et l'émergence de résistances du VIH-1 aux antirétroviraux chez les patients sous ART, de déterminer l'ampleur des infections multiples aux sous-types du VIH-1 chez les HSHs ayant une prévalence au VIH extrêmement élevée, mais aussi de comprendre l'histoire évolutive du sous-type C du VIH-1 qui est majoritaire dans ce groupe à haut risque d'infection ainsi que la dynamique d'une éventuelle transmission de ce sous-type dans la population générale.

La gratuité et l'élargissement du traitement ARV a suscité beaucoup d'espoirs pour la lutte contre le VIH/SIDA et l'amélioration de la qualité de vie des personnes infectées par le VIH dans les pays à ressources limitées. Aujourd'hui, le traitement ARV peut aussi contribuer à réduire la transmission de l'infection. Cependant, les données préliminaires suggèrent que la résistance peut survenir dans les pays où les traitements antirétroviraux sont largement utilisés (Booth et Geretti, 2007; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance *et al.*, 2012; Van de Vijver *et al.*, 2010). L'émergence et la transmission de virus résistants pourraient compromettre l'efficacité de ces traitements, particulièrement dans les pays où les options thérapeutiques sont limitées.

Les résultats de nos études, pris ensemble, ont montré une faible et stable fréquence (<5%) de la transmission de virus VIH-1 résistants aux ARVs dans le pays entre 1998 et 2007. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'après une faible circulation anarchique d'ARV avant 1998, une large disponibilité des ARV grâce à l'ISAARV et un suivi clinique et biologique organisé ont probablement contribué à une meilleure observance. Des résultats similaires (taux de résistance primaire <5%) ont été décrits dans la plupart des premières estimations de résistance transmise en Afrique, juste après l'introduction des ARVs. C'est le cas des études faites au Cameroun entre 2001-2004 (Vessière *et al.*, 2006), entre 2002 et 2004 en Afrique du Sud (Pillay *et al.*, 2008) et en 2005 au Mali (Derache *et al.*, 2007). D'autres études ont par la suite confirmé cette tendance. C'est le cas des études faites en 2006 au Congo (Vidal *et al.*, 2006) et en Tanzanie (Somi *et al.*, 2008) et en 2011 au Botswana (Bussmann *et al.*, 2011). Cependant, dans d'autres pays africains, le seuil de 5% fixé par l'OMS dans le cadre de la surveillance de la résistance a été largement dépassé (Bennett *et al.*, 2008). Une prévalence de résistance de 7% a été rapportée chez des patients nouvellement infectés en

Afrique du Sud (Katoch *et al.*, 2005), de 8,6% en Kampala (Ndembi *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'ensemble de ces données montre que les prévalences de la résistance primaire sont plus faibles dans les pays à ressources limitées comparés aux estimations entre 10 et 17% dans les pays industrialisés tels l'Europe, les Etats-Unis, le Japon et l'Australie (OMS, 2012). Toutefois, il est important de noter que ces pays à ressources limitées ne sont qu'à leur début de l'utilisation accrue d'ARV. Pour la plupart des pays africains, l'introduction des ARV a eu lieu vers les années 2000, alors que pour les pays industrialisés les thérapies ont commencé plus tôt. Cependant, au Sénégal, avec peu d'expérience d'utilisation du traitement antirétroviral, ces résultats sont satisfaisants.

Nous avons trouvé chez les patients sous première ligne de traitement ARV depuis 12 et 24 mois selon les recommandations du programme national à Dakar, un taux élevé de succès virologique (81%, CV<50 copies/ml et 90,5%, CV<500 copies/ml), comparable aux 89% (CV<500 copies/ml) obtenus dans la plus vieille cohorte (ANRS 1215) du Sénégal (De Baudrap *et al.*, 2013). Il était aussi comparable à d'autres études de cohortes dans d'autres pays (Braitstein *et al.*, 2006; Messou *et al.*, 2011; Anude *et al.*, 2013). Ce taux de suppression virologique était aussi comparable à ceux décrits dans d'autres études de programme dans des pays à ressources limitées (Bussmann *et al.*, 2009; Hanson *et al.*, 2009; Barth *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Elul *et al.*, 2013), ainsi que dans des pays développés (Braitstein *et al.*, 2006).

Notre taux d'échec virologique (7,9% à M12 et 10,7% à M24) est plus élevé que le risque d'échec décrit dans la cohorte 1215 à Dakar à M12, mais plus faible que le risque d'échec décrit à M24 dans cette même cohorte (De Baudrap *et al.*, 2012). Il est plus faible que les taux rapportés par plusieurs études dans les pays du sud comme les 31% obtenus au Togo à M12 (Dagnra *et al.*, 2011), les 21% obtenus à M12 en Côte d'Ivoire (Messou *et al.*, 2011) et les 28% (CV>5000 copies/ml) obtenus à M24 en République Centre Africaine (RCA) (Péré *et al.*, 2012).

Le taux global de résistance (6,1%) était plus faible que les 12% obtenus dans une première étude réalisée au sein de cette cohorte en 2005 (Laurent *et al.*, 2005). Cependant, les 6,1% de résistance à M12 étaient 2 fois supérieurs au risque de résistance de 3% décrite dans cette cohorte en 2012 (De Baudrap *et al.*, 2012). Par contre, les 8,6% à M24 étaient compatibles aux risques de résistance de 11% obtenus à M24 dans cette cohorte (De Baudrap *et al.*, 2012). Par ailleurs, le taux global de résistance de 80,4% parmi les patients en échec virologique est en accord avec les 72% décrits dans une étude récente chez des patients suspectés d'échec sous première ligne de traitement selon l'approche de santé publique à Dakar (Thiam *et al.*, 2013).

Par ailleurs, même si les taux d'échec décrits au Togo, en Côte d'Ivoire et en RCA sont plus élevés, les taux de résistance observés parmi les patients en échec virologique sont similaires (79% au Togo et 76% en RCA) ou relativement plus bas (46% en Côte d'Ivoire) que ceux trouvés dans

notre étude (Dagnra *et al.*, 2011; Messou *et al.*, 2011; Péré *et al.*, 2012). Toutefois, nos taux de résistance parmi les patients en échec virologique restent compatibles avec d'autres études réalisées dans les pays à ressources limitées (Bennett *et al.*, 2012; Hamers *et al.*, 2013).

Nos fréquences des résistances (77% à M12 et 84% à M24) parmi les patients en échec virologique étaient compatibles avec un grand nombre d'études réalisées dans des pays industrialisés. Une large étude conduite entre 2000 et 2004 chez 1988 patients en échec virologique dans 15 pays Européens a décrit près de 81% de résistance (Van de Vijver *et al.*, 2010). C'est aussi le cas d'une autre étude dans 7 pays européens entre 1999 et 2008, qui montre 80% de résistance (Prosperi *et al.*, 2011). Un total de 70% et 66% de résistance parmi des patients en échec virologique a été décrit en Italie en 2007 et 2009 respectivement (Di Giambenedetto *et al.*, 2011). C'est aussi le cas d'une étude réalisée en Colombie-Britannique chez 5422 patients sous ARV avec un taux de 88% (Gill *et al.*, 2010). Plusieurs études de cohortes avaient montré qu'avec un bon suivi virologique dans les pays à ressources limitées, le traitement ARV pouvait donner des taux d'efficacité similaires à ceux qui sont obtenus dans les pays développés (Braitstein *et al.*, 2006; Seyler *et al.*, 2007; Anudé *et al.*, 2013; Elul *et al.*, 2013).

Les profils de mutations observés dans cette étude étaient compatibles avec l'utilisation généralisée de la Combivir (AZT+3TC) ou le Ténolam (TDF+3TC) associée à l'EFV ou la NVP comme première ligne de traitement dans le pays. Comme décrit par les études récentes au Sénégal (De Baudrap *et al.*, 2013; Kebe *et al.*, 2013) et dans d'autres pays africains (Dagnra *et al.*, 2011; Hanson *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2013), les mutations les plus fréquemment observées étaient la M184V/I et les TAMS pour les INTI, la K103N et Y181C pour les INNTI. Pour ces mutations, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux temps de suivi, suggérant qu'elles apparaissent dès le début du TAR, puis se stabilisent dans la durée comme décrit dans d'autres études africaines (Barth *et al.*, 2010; Muwonga *et al.*, 2011; Aghokeng *et al.*, 2013). L'autre mutation la plus importante de résistance aux INTI était la K65R (16% à M12 et 4% à M24) observée chez des patients sous TDF ou d4T dont le taux était légèrement plus élevé que les 11% décrits au Nigeria (Hawkins *et al.*, 2009).

Les taux de plus de 10% de résistances croisées à ABC et DDI (14,3% et 10,7% respectivement) suggèrent que l'utilisation de ces INTI dans les régimes de deuxième ligne d'ART pourrait être compromise. L'utilisation de l'ETR et RPV (nouvelle deuxième génération d'INNTI) semble aussi être compromise dans environ 17,9% et 33,9% des patients respectivement, en dépit du fait que ces molécules ne sont pas disponibles au Sénégal. Pour ces résistances, les mutations les

plus fréquemment observées étaient Y181C et K101E, seules ou associées à d'autres mutations. Ce résultat est conforme aux données obtenues dans d'autres études qui avaient décrit une sélection majoritaire de Y181C et G190A associée à la résistance à ETR et RPV (Wallis *et al.*, 2010; Sigaloff *et al.*, 2011; Hamers *et al.*, 2013). Cependant, il était différent des résultats décrits dans une autre étude qui a montré que la mutation E138K était la plus fréquemment retrouvée au cours du traitement avec RPV (Schafer et Short, 2012). Ces résultats suggèrent que ces ARVs de deuxième génération ont peu de chances d'être efficaces dans un traitement ARV de deuxième intention pour un bon nombre de patients.

Les différences observées selon les sites peuvent s'expliquer par la qualité du monitoring des PVVIHs. En effet, même la charge virale est gratuite et disponible dans la région de Dakar, 25% des patients inclus n'avaient pas de CV jusqu'à M12 ou M24. Cela était particulièrement très important dans les sites de HALD, IHS, CPS et Rufisque où 90%, 64%, 61% et 92% respectivement n'avaient aucune charge virale avant le recrutement et où les taux d'échec virologique étaient plus élevés. Dans le site de RB, même si seuls 4,5% des patients n'ont pas eu de CV avant, seulement 27% avaient un suivi virologique régulier avec au moins une CV avant M12 et 3 avant M24. Or il a été montré que l'utilisation de la CV dans le monitoring des PVVIHs sous TAR pouvait réduire l'accumulation des mutations de résistance (Reynolds *et al.*, 2012). De même il a aussi été décrit que les stratégies de monitoring utilisant les CD4 sans la CV ne maximisent pas les bénéfices du TAR (Braithwaite *et al.*, 2011; OMS, 2013).

Ainsi, la large disponibilité des ARV au Sénégal, associée à un suivi clinique et biologique gratuit et organisé, a certainement contribué à une bonne adhérence au traitement et à un faible taux d'échec parmi les patients suivis selon les recommandations du programme national. Cependant, les différences observées avec les autres études africaines peuvent être liées à des problèmes de management et de gestion des stocks d'ARVs, ou de disponibilité de la charge virale dans certains pays. Ces données suggèrent qu'en dehors des cohortes bien structurées, avec un suivi virologique régulier dans les pays à ressources limitées, le traitement ARV pouvait donner des taux d'efficacité similaires à ceux qui sont obtenus dans les pays du nord.

Nos travaux de thèse ont montré une grande diversité des souches de VIH-1 circulant dans le pays avec une prédominance du CRF02_AG (64% chez les patients naïfs d'ARV et 47% chez ceux sous première ligne). Cette prédominance du CRF02_AG dans la population générale adulte confirme celle décrite précédemment dans le pays avec 77% en 2000 (Touré-Kane *et al.*, 2000) et 60% en 2013 (Thiam *et al.*, 2013). Cette diversité génétique du VIH-1 dans la population générale reste aussi comparable à celle retrouvée chez les enfants (Kébé *et al.*, 2013) et dans le groupe des

professionnelles du sexe (Hamel *et al.*, 2007). Ces résultats pris ensemble montrent que le CRF02_AG est stable et maintient sa prédominance depuis près de 13 ans dans la population générale au Sénégal. Cependant, ils suggèrent une diminution dans le temps de cette forme du VIH-1 dans la population générale au bénéfice de recombinaisons uniques (URFs). Ces nouvelles formes recombinantes pourraient refléter la diversification de l'épidémie de VIH-1 dans le pays et cela en raison de comportements à risque, d'échanges avec des pays voisins et d'événements de recombinaison au sein de la population locale. Ces résultats sont compatibles avec plusieurs études réalisées en Afrique de l'Ouest. Une diminution dans le temps de la fréquence du CRF02_AG a été décrite au Mali, accompagnée d'une émergence du CRF13_cpx et d'URFs (Derache *et al.*, 2008; 2007; Haidara *et al.*, 2010).

Nous avons aussi noté des différences sur la fréquence du sous-type C obtenue dans le pays. Une proportion importante du sous-type C (14,5%) a été retrouvée, comparée aux 4% en 2000 (Touré-Kane *et al.*, 2000); 7% en 2010 (Diop-Ndiaye *et al.*, 2010) et 6,9% en 2013 (Thiam *et al.*, 2013). Or, il a été décrit que le sous-type C était majoritaire dans le groupe des HSHs parmi lesquels près de 90% ont affirmé avoir des partenaires sexuelles féminines, et pourraient donc servir de pont envers la population générale féminine (Larmarange *et al.*, 2010; Wade *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2012; Ndiaye *et al.*, 2013). Par ailleurs, cette importante proportion du sous-type C pouvait être expliquée par la haute capacité de réplication du sous-type C comparée à celle des autres sous-types (Rodriguez *et al.*, 2009).

Actuellement, on ne peut parler d'éradication complète car le virus persiste sous forme latente comme le démontre le rebond spectaculaire de la charge virale lors d'interruptions du traitement. Le réservoir viral est donc un obstacle majeur dans le traitement de l'infection. Une diversité virale réduite pourrait être bénéfique pour le contrôle de l'infection à long terme par le système immunitaire. Cependant, en cas de doubles infections, la population virale composée d'une multitude de variants de VIH peut être à l'origine de la formation de nouveaux recombinaisons parfois difficiles à éradiquer.

Par conséquent, dans notre troisième étude de la thèse, nous avons étudié dans quelle mesure, les infections multiples avec différents variants du VIH-1 se produisent dans un groupe de population ayant des comportements à haut risque, une forte prévalence du VIH-1 et dans une zone où plusieurs sous-types et CRFs du VIH-1 co-circulent. Le Sénégal est un pays où la prévalence de l'infection à VIH dans le groupe des HSHs est 27,6 fois plus élevée que dans la population générale, un fait existant dans de nombreux autres pays. Ces travaux de thèse suggèrent qu'au moins 32% à 36% des 69 HSHs de cette étude sont infectés par plus d'une souche de VIH-1. Il s'agit d'une estimation minimale, car les sondes utilisées dans la MHA n'ont détecté que 79,7% des infections dans *gag*, et 86,9% dans *vpu*. Ces taux de détection sont un peu plus bas que les 88,3% et 93,3%

précédemment rapportés dans les mêmes régions pour le développement de la MHA (Vidal *et al.*, 2013). Cependant, il est à noter que dans la population de HSH, une forte proportion de souches de VIH-1 sont groupées en chaînes de transmission (Ndiaye *et al.*, 2009; 2013). Par conséquent, l'existence de mésappariements entre la sonde et les virus des patients dont les séquences sont regroupées en clusters pourrait être à l'origine du taux d'échec plus élevé des sondes. En outre cette sous-estimation pourrait aussi être due à la co-infection avec des variants du VIH-1 pour lesquels il n'existe pas de sondes dans notre test. C'est le cas des souches H, ou CRF09_cpx, qui ont été documentées au Sénégal (Touré-Kane *et al.*, 2000; Diop-Ndiaye *et al.* 2010).

Dans la précédente étude sur le développement de la MHA (Vidal *et al.*, 2013), le panel comportait 70 échantillons de la population générale du Sénégal fréquentant les hôpitaux de Dakar qui initiaient leur traitement antirétroviral. Parmi ces 70 patients (56 CRF02_AG, 3 A, 5 B, 5 C et 1 CRF06_cpx), seuls trois échantillons (4,3%) ont été identifiés comme co-infectés par MHA (Vidal *et al.*, 2013). Notre estimation globale de 34,8% d'infection par plus d'une souche parmi les 69 HSHs est huit fois plus élevée que ce taux de 4,3% obtenu parmi les 70 patients de la population générale, soulignant ainsi l'importance du comportement à risque dans les doubles infections.

Nos résultats obtenus dans le groupe des HSHs étaient plus élevés que ceux d'autres études sur des groupes à haut risque qui ont décrit environ 20% de doubles infections chez les travailleuses du sexe en Afrique de l'Est ou des consommateurs de drogues injectables en Inde et 9% chez des femmes à haut risque d'infection en Afrique du Sud, infectées par le sous-type C (Herbinger *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2009; Woodman *et al.*, 2011; Ssemwanga *et al.*, 2012). Cependant, dans ces régions géographiques, la diversité génétique du VIH-1 est moindre qu'en Afrique de l'Ouest, les MHA régionales utilisées ciblent moins de variants, et les doubles infections avec des variants différents sont probablement moins nombreuses que les doubles infections avec le même variant, ce que ne détectent pas les MHAs utilisées.

Un fait remarquable dans le groupe des HSHs est le taux important de doubles infections C+C retrouvé grâce aux deux profils de sondes C dans *gag*.

La double infection par deux souches différentes de sous-type C n'a pas pu être confirmée par SGA dans le gène *gag* parce que nous n'avons obtenu qu'une seule souche, mais la SGA dans *vpu* a permis d'isoler chez un même patient deux variants du sous-type C. Ce résultat pourrait être surprenant, mais il est à noter que la SGA est moins sensible que les méthodes utilisant le *deep-sequencing* pour détecter les doubles infections (Redd *et al.*, 2012).

Surtout, il est important de noter que cette SGA dans *vpu* a permis de démontrer que la souche du sous-type C minoritaire était identique à la souche majoritaire portée cinq ans auparavant par une femme de la population générale. Cette observation confirme clairement le brassage des variants du VIH-1 entre les femmes à faible risque et les hommes à haut risque. Du fait de l'illégalité de

l'homosexualité au Sénégal, les HSHs ont aussi une vie maritale ou hétérosexuelle classique, et l'éventualité d'un mélange des souches entre les 2 groupes de populations avait déjà été soupçonnée (Ndiaye *et al.*, 2009; Wade *et al.*, 2010 ; Poteat *et al.*, 2011).

Enfin, notre dernière étude a démontré une subdivision phylo-géographique importante des souches du VIH-1 de sous-type C circulant en Asie, en Amérique, en Afrique de l'Est contrairement à celles circulant en Europe. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont aussi montré des clusters géographiques du sous-type C (Dalai *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2011; Thomson et Fernández-García, 2011). Elle a confirmé le lien épidémiologique existant entre les souches du VIH-1 circulant au Brésil et en Afrique de l'Est (Bello *et al.*, 2008; Fontella *et al.*, 2008; Véras *et al.*, 2011). Elle confirme les liens épidémiologiques entre le Sénégal et les autres pays d'Afrique décrits lors de la première étude moléculaire (Toure-Kane *et al.*, 2000). Cette étude a aussi montré que la majorité des souches du VIH-1/C du Sénégal, y compris celles qui circulent parmi les HSH, sont plus étroitement liées à celles provenant d'Afrique australe, principalement de la Zambie. Il était aussi important de noter que le clade des HSH contient également des souches infectant des hommes de la population générale, non identifiés comme HSHs. Cela suggère que ces derniers ont eu des rapports sexuels avec d'autres hommes ou ont été infectés via la population générale féminine.

Notre reconstruction de l'origine et de l'évolution du VIH-1 du sous-type C au Sénégal a montré de multiples introductions de ce variant dans la population générale provenant de deux régions Africaines différentes (Afrique de l'est et Afrique australe), et une introduction unique dans le groupe des HSHs. Au Sénégal, plusieurs études préalablement citées ont montré qu'en plus du sous-type C majoritaire chez les HSHs et du CRF02_AG dans la population générale, plusieurs autres variants circulent (Ndiaye *et al.*, 2009; Diop-Ndiaye *et al.*, 2010; Thiam *et al.*, 2013) suggérant aussi de multiples introductions du VIH dans le pays. Ceci est probablement lié aux activités commerciales importantes et aux migrations entre le Sénégal et de nombreux autres pays africains (Kane *et al.*, 1993).

Notre estimation de l'ancêtre commun du VIH-1 sous-type C circulant dans la population générale au Sénégal n'est pas spécifique, car plusieurs introductions de C ont eu lieu dans le pays. La date estimée est relativement proche à celles estimées dans d'autres pays africains. Elle est estimée en 1966 en Éthiopie (Tully et Wood, 2010), à partir des années 70 pour le Zimbabwe (Dalai *et al.*, 2009), ou à la fin des années 60 pour le Malawi (Travers *et al.*, 2004). Contrairement aux pays de l'Afrique Australe, ce sous-type n'est pas devenu la souche majoritaire dans la population générale au Sénégal. Toutefois, une diffusion importante a eu lieu dans le groupe des HSHs, soulignant l'importance des comportements à haut risque dans la propagation du virus (McDaid et Hart, 2010). Cette épidémie provient d'un évènement fondateur avec un ancêtre commun originaire d'un pays

d'Afrique australe, probablement de la Zambie. Elle est assez récente (début des années 80) comparée à celle en Éthiopie ou celle au Malawi. Selon l'analyse bayésienne, cette estimation coïncide avec la période où l'épidémie de VIH-1 C a commencé une rapide phase de croissance exponentielle au Sénégal.

Il a été décrit que le sous-type C pourrait se propager plus efficacement du fait de la prédominance de variants à tropisme R5 qui ont une forte prédisposition à se localiser dans la muqueuse génitale féminine. Il en résulte une capacité de transmission hétérosexuelle ou verticale plus importante qu'avec les autres variants du VIH-1 (Renjifo *et al.*, 2004; John-Stewart *et al.*, 2005; Abraha *et al.*, 2009). En plus, il présente une forte capacité de réplication comparé à d'autres sous-types (Rodriguez *et al.*, 2009) notamment dans le tube digestif (Centlivre *et al.*, 2006). Cette augmentation de la prévalence du sous-type C pourrait aussi avoir des répercussions sur le traitement ARV, en raison des mutations spécifiques et des problèmes de détection de ce sous-type par certains tests de résistance (Vergne *et al.*, 2006; Martinez-Cajas *et al.*, 2009).

Globalement, le Sénégal est relativement peu touché par l'infection à VIH, contrairement à d'autres pays de l'Afrique Sub-saharienne. Depuis 1989, la prévalence de l'infection par le VIH y est restée stable, autour de 1% dans la population générale. Cette situation pourrait être due à une prise de conscience précoce du problème par les autorités du pays (un plan national de lutte a été mis en place dès l'année 1986) et à une politique efficace de prévention. Les prévalences restent néanmoins élevées dans les populations clés, comme partout ailleurs (PS, les HSHs et les UDI). Du fait que plusieurs HSHs ont rapporté avoir des partenaires sexuelles féminines, ils pourraient servir de pont entre le groupe à haut risque et la population générale surtout féminine. Ce brassage sexuel pourrait contribuer à une augmentation ultérieure du sous-type C dans la population générale.

Conclusion

Les travaux effectués dans cette thèse ont, en partie permis de documenter l'efficacité virologique du traitement ARV au Sénégal, après près de 15 ans d'utilisation; ainsi que l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 chez les HSHs et la population générale au Sénégal. Nous retenons de cette thèse que le traitement ARV dans un contexte de vie réelle à Dakar présente une efficacité similaire à celle des pays industrialisés, avec un faible taux global d'échec virologique sous traitement ARV et de résistance transmise dans le pays. Nous avons documenté dans le pays, les doubles infections avec des variants différents du VIH-1 groupe M et avons montré que la prévalence est 8 fois plus élevée chez les HSHs que dans la population générale. Par ailleurs, nous avons aussi confirmé le mélange de variants C entre les deux groupes de populations. Notre reconstruction de l'origine et de l'évolution de ce dernier a montré de multiples introductions dans la population générale provenant d'Afrique de l'Est et australe dans les années 70, et une introduction unique

dans le groupe des HSHs qui provient d'un évènement fondateur avec un ancêtre commun originaire d'Afrique australe, probablement de la Zambie 10 ans après la population générale.

Recommandations

Face à la pandémie du VIH/SIDA, et devant les taux d'échec et de résistance importants observés, la forte prévalence d'infections multiples du VIH dans le groupe des HSHs et la grande diversité génétique du VIH-1 dans le pays, nous recommandons:

- De renforcer l'éducation des patients avant la mise sous traitement ARV et de renforcer l'observance de ceux qui sont sous TAR;
- De rendre accessible le bilan immuno-virologique à toutes les PVVIHs afin de permettre un meilleur suivi du TAR;
- De coordonner les activités des différents sites de prise en charge;
- D'accentuer l'utilisation du papier buvard pour le suivi des PVVIHs surtout en milieu décentralisé, en renforçant le circuit d'acheminement des prélèvements;
- D'améliorer les programmes visant à soutenir les programmes de prévention ciblant les groupes à risque (HSH et probablement d'autres groupes) au Sénégal. Car, si les épidémies au sein de ces groupes ne sont pas prises en charge, elles peuvent se propager à toute la population, à travers leurs pratiques hétérosexuelles.

Perspectives

- La première partie de cette thèse a montré des résultats satisfaisants mais des études complémentaires dans d'autres régions du pays sont nécessaires pour évaluer les résultats virologiques et les taux de résistance aux médicaments à travers tous les sites décentralisés du pays;
- Séquençage des variants minoritaires, surtout pour les patients ayant une CV comprise entre seuil et 1000 copies/ml et ceux en échec virologique mais dont le virus majoritaire n'est pas résistant, pour avoir une image complète de la résistance;
- De documenter le taux de résistance primaire aux molécules non disponibles comme les inhibiteurs d'intégrase;
- Toutefois, une surveillance continue des variants du VIH semble nécessaire dans l'adaptation des traitements et des stratégies de vaccination pour une efficacité locale contemporaine;
- Pour une amélioration de la caractérisation et une surveillance de la propagation des virus, il serait important de comprendre les origines et les modes de dispersion des sous-types du VIH-1 aux niveaux régional et national. Par conséquent, il est indispensable d'étudier l'origine géographique et temporelle du CRF02_AG qui constitue avec le sous-type C les variants les plus prévalents dans le pays;

- Il serait aussi important d'étudier les doubles infections dans d'autres populations clés comme les PS et les IDU.

Valorisation de la thèse

Publications scientifiques

1. Leye N, Diop-Ndiaye H, Sow A, Ndiaye O, Diouara AAM, Diallo S, Diaw-Diouf NA, Diop O, Thiam M, Tchacpé E, Kébé K, Ngom-Gueye NF, Ayouba A, Peeters M, Mboup S and Toure-Kane C. HIV-1 virological failure and drug resistance mutations at 12 and 24 Months of First-Line Antiretroviral Treatment in Dakar (Senegal). *Journal of Medical Virologie (in press)*

2. Leye N, Vidal N, Ndiaye O, Diop-Ndiaye H, Wade AS, Mboup S, Delaporte E, Toure-Kane C and Peeters M. High frequency of HIV-1 infections with multiple HIV-1 strains in men having sex with men (MSM) in Senegal. *Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases Journal*. 20; 206–214 (2013).

3. Jung M, Leye N, Vidal N, Fargette D, Diop H, Toure Kane C, Gascuel O, Peeters M. The Origin and Evolutionary History of HIV-1 Subtype C in Senegal. *PLoS ONE* ; 7(3): e33579, (2012).

4. Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Leye N, Ngom-Gueye NF, Montavon C, Peeters M, Mboup S. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients from Senegal. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26 (10):1133-8, (2010).

Communications orales

1. N. Leye, N. Vidal, O. Ndiaye, H. Diop-Ndiaye, E. Tchiakpé, A.A.M. Diouara, M. Thiam, K. Kébé, A. Sow, A.S. Wade, S. Mboup, E. Delaporte, M. Peeters, C. Touré-Kane. Détection par MHA de doubles infections du VIH-1 chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes et la population générale au Sénégal. **7th INTEREST workshop**, Dakar, Sénégal, Mai, 14-17, 2013, (Lauréat Best Abstract 2013)

2. N Leye. Echec virologique et résistances aux ARVs chez des patients VIH-1 positifs pris en charge dans les programmes et structures nationaux au Sénégal (Projet ANRS12186). **Journée scientifique du site ANRS**, Dakar 31-05-2012

3. N Leye. Origine et histoire évolutive du sous-type C du VIH-1 au Sénégal. **Journée scientifique du site ANRS**, Dakar 31-05-2012.

4. **N Leye.** Echec Virologique et Résistance du VIH-1 après 12 et 24 Mois de Traitement de 1ère Ligne au Sénégal (Projet ANRS 12186). **Doctoriales ED-SEV/UCAD**, Dakar, Janvier 16-17, **2012**.

5. **N Leye,** O Ndiaye, H Diop-Ndiaye, A Robalo Djassi, AAM Diouara, B Ouattara, C Dieng, K Kébé, A Sow-Sall, M Thiam, M Monleau, A Ahidjo, C Touré-Kane, S. Mboup. Echec virologique et résistance du VIH-1 aux ARVs après 12 et 24 mois de traitement de 1ère ligne au Sénégal (projet ANRS 12186). **16th International Conference on AIDS & STIs in Africa Addis Ababa, Ethiopia**, December, 4-8, (MOAB0103) **2011**, (**Lauréat Prix Jeune Chercheur pour le Volet B: Recherche Clinique, Traitements et Soins**).

6. O Ndiaye, **N Leye,** N Vidal, H Diop-Ndiaye, E Tchiakpe, K Kébé, M Thiam, A Diouara, AS Wade, C Toure-Kane, M Peeters, S Mboup. Détection de co-infections avec plusieurs variants VIH-1 chez les MSM au Sénégal. **5ème Conférence Francophone VIH/SIDA, Casablanca, Maroc**, Mars, 28 – 31 (Résumé N°243/50A) **2010**.

Posters

1. **N Leye,** N. Vidal, O. Ndiaye, H. Diop-Ndiaye, E. Tchiakpè, M. Thiam, K. Kébé, A.A.M. Diouara, A.S. Wade, C. Touré-Kane, M. Peeters, S. Mboup. HIV-1/M circulating strains and dual infections in men having sex with men (MSM) versus general population in Senegal the **6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Italy**, July 17-20 (abstract MOPE099) **2011**.

2. H. Diop-Ndiaye, C. Touré-Kane, **N. Leye,** K. Kébé, N.F. Ngom-Guèye, B. Ouattara, A. Ahidjo, M. Peeters and S. Mboup. Low prevalence of HIV primary drug resistance in Senegal. TUPE0022 XVII International AIDS Conference Mexico City, August, 3-8 2008.

Références bibliographiques

(435 références)

- Abraha, A., Nankya, I.L., Gibson, R., Demers, K., Tebit, D.M., Johnston, E., Katzenstein, D., Siddiqui, A., Herrera, C., Fischetti, L., Shattock, R.J., Arts, Eric J, 2009. CCR5- and CXCR4-tropic subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates have a lower level of pathogenic fitness than other dominant group M subtypes: implications for the epidemic. *J. Virol.* 83, 5592–5605.
- Alaeus, A., Lidman, K., Björkman, A., Giesecke, J., Albert, J, 1999. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* 13, 901–907.
- Amendola, A., Bordi, L., Angeletti, C., Visco-Comandini, U., Abbate, I., Cappiello, G., Budabbus, M.A., Eljhwawi, O.A., Mehabresh, M.I., Girardi, E., Antinori, A., Ippolito, G., Capobianchi, M.R., 2002. Underevaluation of HIV-1 plasma viral load by a commercially available assay in a cluster of patients infected with HIV-1 A/G circulating recombinant form (CRF02). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 31, 488–494.
- Ananworanich, J., Phanuphak, N., De Souza, M., Paris, R., Arroyo, M., Trichavaroj, R., Sirivichayakul, S., Shikuma, C., Phanuphak, P., Kim, J.H., 2008. Incidence and characterization of acute HIV-1 infection in a high-risk Thai population. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 49, 151–155.
- Anastassopoulou, C.G., Ketas, T.J., Klasse, Per Johan, Moore, John P, 2009. Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5318–5323.
- Andersen, J.L., Le Rouzic, E., Planelles, V., 2008. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 2–10.
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Anude, C.J., Eze, E., Onyegbutulem, H.C., Charurat, M., Etiebet, M.-A., Ajayi, S., Dakum, P., Akinwande, O., Beyrer, C., Abimiku, A., Blattner, W., 2013. Immuno-virologic outcomes and immuno-virologic discordance among adults alive and on anti-retroviral therapy at 12 months in Nigeria. *BMC Infect. Dis.* 13, 113.
- Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Damond, F., Saragosti, S., Brun-Vézinet, F., Simon, F, 1996. Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions. *AIDS* 10, F57–60.
- Arrigo, S.J., Chen, I.S., 1991. Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* 5, 808–819.
- Arts, Eric J, Hazuda, D.J., 2012. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007161.
- Ayoub, A, Maucière, P, Martin, P.M., Cunin, P., Mfoupouendoun, J., Njinku, B., Souquière, S., Simon, F, 2001. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerging Infect. Dis.* 7, 466–467.
- Ayoub, A, Souquière, S., Njinku, B., Martin, P.M., Müller-Trutwin, M C, Roques, P, Barré-Sinoussi, F, Maucière, P, Simon, F, Nerrienet, E, 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 14, 2623–2625.
- Ayoub, Ahidjo, Akoua-Koffi, C., Calvignac-Spencer, S., Esteban, A., Locatelli, S., Li, H., Li, Yingying, Hahn, Beatrice H, Delaporte, Eric, Leendertz, F.H., Peeters, Martine, 2013. Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS*.
- Baba, M., Miyake, H., Wang, X., Okamoto, M., Takashima, K., 2007. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 707–715.
- Baeten, J.M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R.S., Certain, L., Mandaliya, Kishorchandra, Jaoko, W., Overbaugh, J., 2007. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* 195, 1177–1180.
- Ball, R.A., Kinchelov, T., 2003. Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 826–831.
- Baral, S., Beyrer, C., Muessig, K., Poteat, T., Wirtz, A.L., Decker, M.R., Sherman, S.G., Kerrigan, D., 2012. Burden of HIV among female sex workers in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12, 538–549.
- Baral, S., Sifakis, F., Cleghorn, F., Beyrer, C., 2007. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low- and middle-income countries 2000-2006: a systematic review. *PLoS Med.* 4, e339.
- Barbour, J.D., Grant, R.M., 2005. The role of viral fitness in HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2, 29–34.
- 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.
- Barin, Francis, Cazein, Françoise, Lot, F., Pillonel, J., Brunet, S., Thierry, D., Damond, Florence, Brun-Vézinet, Françoise, Desenclos, J.-C., Semaille, C., 2007. Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. *AIDS* 21, 2351–2353.
- Barré-Sinoussi, F, Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-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* 220, 868–871.

- Barth, R.E., Van der Loeff, M.F.S., Schuurman, Rob, Hoepelman, A.I.M., Wensing, Annemarie M J, 2010. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 10, 155–166.
- Bártolo, I., Rocha, C., Bartolomeu, J., Gama, A., Marcelino, R., Fonseca, M., Mendes, A., Epalanga, M., Silva, P.C., Taveira, N., 2009. Highly divergent subtypes and new recombinant forms prevail in the HIV/AIDS epidemic in Angola: new insights into the origins of the AIDS pandemic. *Infect. Genet. Evol.* 9, 672–682.
- Basavapathruni, A., Bailey, C.M., Anderson, Karen S, 2004. Defining a molecular mechanism of synergy between nucleoside and nonnucleoside AIDS drugs. *J. Biol. Chem.* 279, 6221–6224.
- Bauby, H., Lopez-Vergès, S., Berlioz-Torrent, C., 2008. TIP47, un cofacteur cellulaire essentiel à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la particule virale. *Virologie* 12, 201–13.
- Bello, G., Passaes, C.P., Guimarães, M.L., Lorete, R.S., Matos Almeida, Sabrina E, Medeiros, Rubia M, Alencastro, P.R., Morgado, M.G., 2008. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 22, 1993–2000.
- Bennett, D.E., Jordan, M.R., Bertagnolio, S., Hong, S.Y., Ravasi, G., McMahon, J.H., Saadani, A., Kelley, K.F., 2012. HIV drug resistance early warning indicators in cohorts of individuals starting antiretroviral therapy between 2004 and 2009: World Health Organization global report from 50 countries. *Clin. Infect. Dis.* 54 Suppl 4, S280–289.
- Bennett, D.E., Myatt, M., Bertagnolio, S., Sutherland, D., Gilks, C.F., 2008. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir. Ther. (Lond.)* 13 Suppl 2, 25–36.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657–700.
- Berro, R., Sanders, R.W., Lu, M., Klasse, Per J, Moore, John P, 2009. Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry. *PLoS Pathog.* 5, e1000548.
- Beyrer, C., Baral, S.D., Van Griensven, F., Goodreau, S.M., Chariyalertsak, S., Wirtz, A.L., Brookmeyer, R., 2012. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet* 380, 367–377.
- Binette, J., Dubé, M., Mercier, J., Halawani, D., Latterich, M., Cohen, E.A., 2007. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology* 4, 75.
- Blackard, J.T., Cohen, D.E., Mayer, K.H., 2002. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1108–1114.
- Bochner, R., Duvshani, A., Adir, N., Hizi, A, 2008. Mutagenesis of Gln294 of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-2 and its effects on the ribonuclease H activity. *FEBS Lett.* 582, 2799–2805.
- Booth, C.L., Geretti, A.M., 2007. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1047–1056.
- Boucher, C A, Cammack, N, Schipper, P., Schuurman, R, Rouse, P., Wainberg, M A, Cameron, J.M., 1993. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2231–2234.
- Boyer, Paul L, Sarafianos, Stefan G, Arnold, Edward, Hughes, Stephen H, 2002. Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision. *J. Virol.* 76, 9143–9151.
- Braithwaite, R.S., Nucifora, K.A., Yiannoutsos, C.T., Musick, B., Kimaiyo, S., Diero, L., Bacon, M.C., Wools-Kaloustian, K., 2011. Alternative antiretroviral monitoring strategies for HIV-infected patients in east Africa: opportunities to save more lives? *J Int AIDS Soc* 14, 38.
- Braitstein, P., Brinkhof, M.W.G., Dabis, F., Schechter, M., Boulle, A., Miotti, P., Wood, R., Laurent, C., Sprinz, E., Seyler, C., Bangsberg, D.R., Balestre, E., Sterne, J.A.C., May, M., Egger, M., 2006. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet* 367, 817–824.
- Brandt, S., Blissenbach, M., Grewe, B., Konietzny, R., Grunwald, T., Uberla, K., 2007. Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. *PLoS Pathog.* 3, e54.
- 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., Gürtler, Lutz G, Zekeng, Leopold, Kaptué, L., 2008. The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 49, 432–439.
- Brenner, B.G., Coutinos, D., 2009. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications. *HIV Ther* 3, 583–594.
- Brenner, B.G., Oliveira, M., Doualla-Bell, F., Moisi, D.D., Ntemgwa, M., Frankel, F., Essex, Max, Wainberg, Mark A, 2006. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* 20, F9–13.
- Brun-Vézinet, Françoise, Descamps, Diane, Ruffault, A., Masquelier, B., Calvez, Vincent, Peytavin, G., Telles, F., Morand-Joubert, L., Meynard, J.-L., Vray, M., Costagliola, D., 2003. Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *AIDS* 17, 1795–1802.
- Buonaguro, L., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* 81, 10209–10219.

- Bussmann, H., De la Hoz Gomez, F., Roels, T.H., Wester, C.W., Bodika, S.M., Moyo, S., Taffa, N., Anderson, M.G., Mine, M., Bile, E.-C., Yang, Chunfu, Mphoyakgosi, K., Lehotzky, E.A., Mlotshwa, B., Mmeseles, M., Seipone, K., Makhema, M.J., Marlink, Richard G, Novitsky, V., Essex, M, 2011. Prevalence of transmitted HIV drug resistance in Botswana: lessons learned from the HIVDR-Threshold Survey conducted among women presenting for routine antenatal care as part of the 2007 national sentinel survey. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, 365–372.
- Bussmann, H., Wester, C.W., Thomas, A., Novitsky, V., Okezie, R., Muzenda, T., Gaolathe, T., Ndwapi, N., Mawoko, N., Widenfelt, E., Moyo, S., Musonda, R., Mine, M., Makhema, J., Moffat, H., Essex, Max, Degruittola, V., Marlink, Richard G, 2009. Response to zidovudine/didanosine-containing combination antiretroviral therapy among HIV-1 subtype C-infected adults in Botswana: two-year outcomes from a randomized clinical trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 37–46.
- Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M.M., Weissenhorn, W., 2010. Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog.* 6, e1000880.
- Cancio, R., Spadari, S., Maga, G., 2004. Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem. J.* 383, 475–482.
- Caputo, A., Gavioli, R., Bellino, S., Longo, O., Tripiciano, A., Francavilla, V., Sgadari, C., Paniccchia, G., Titti, F., Cafaro, A., Ferrantelli, F., Monini, P., Ensoli, F., Ensoli, B., 2009. HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development. *Int. Rev. Immunol.* 28, 285–334.
- Cardoso, L.P.V., Queiroz, B.B. de, Stefani, M.M. de A., 2009. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J. Clin. Virol.* 46, 134–139.
- 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.
- Carr, Jean K, Osinusi, A., Flynn, C.P., Gilliam, B.L., Maheshwari, V., Zhao, Richard Y, 2010. Two independent epidemics of HIV in Maryland. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54, 297–303.
- Casartelli, N., Sourisseau, M., Feldmann, J., Guivel-Benhassine, F., Mallet, A., Marcelin, Anne-Geneviève, Guatelli, J., Schwartz, O., 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* 6, e1000955.
- Centlivre, M., Sommer, P., Michel, M., Ho Tsong Fang, R., Gofflo, S., Valladeau, J., Schmitt, N., Wain-Hobson, Simon, Sala, M., 2006. The HIV-1 clade C promoter is particularly well adapted to replication in the gut in primary infection. *AIDS* 20, 657–666.
- 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.
- Chan, J H, Hong, J.S., Hunter, R.N., 3rd, Orr, G.F., Cowan, J.R., Sherman, D.B., Sparks, S.M., Reitter, B.E., Andrews, C.W., 3rd, Hazen, R.J., St Clair, M., Boone, L.R., Ferris, R.G., Creech, K.L., Roberts, G.B., Short, S A, Weaver, K., Ott, R.J., Ren, J, Hopkins, A., Stuart, D I, Stammers, D K, 2001. 2-Amino-6-arylsulfonylbenzotrioles as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1. *J. Med. Chem.* 44, 1866–1882.
- Chan, P.A., Kantor, R., 2009. Transmitted drug resistance in nonsubtype B HIV-1 infection. *HIV Ther* 3, 447–465.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Hurley, J.H., Bonifacino, J.S., 2007. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J. Virol.* 81, 3877–3890.
- Chen Y, Balakrishnan M, Roques BP, Bambara RA. Steps of the acceptor invasion mechanism for HIV-1 minus strand strong stop transfer. *J Biol Chem* 2003; 278:38368-38375.
- Chen, Z, Luckay, A., Sodora, D L, Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J.M., Sadek, R.F., Yee, J., Ho, D D, Zhang, L, Marx, P A, 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* 71, 3953–3960.
- Chermann, J.C., Barré-Sinoussi, F, Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C, Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother* 32, 48–53.
- Chibo, D., Birch, C., 2012. Increasing diversity of Human Immunodeficiency Virus type 1 subtypes circulating in Australia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 578–583.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 49, 118–124.
- CNLS-Sénégal. 2012. Rapport de situation sur la riposte nationale à l'épidémie de VIH/SIDA Sénégal : 2010-2011.1-94. Available from: http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report%5B2011%5D.pdf [Consulté le 16 juin 2013].
- Coffin, J M, 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176, 143–164.
- Coffin JM. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* 1979; 42:1-26.

- Curlin, M.E., Gottlieb, G.S., Hawes, S.E., Sow, Papa Salif, Ndoye, Ibra, Critchlow, C.W., Kiviat, N.B., Mullins, James I, 2004. No evidence for recombination between HIV type 1 and HIV type 2 within the envelope region in dually seropositive individuals from Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 958–963.
- Dagnra, A.Y., Vidal, Nicole, Mensah, A., Patassi, A., Aho, K., Salou, M., Monleau, M., Prince-David, M., Singo, A., Pitche, P., Delaporte, Eric, Peeters, Martine, 2011. High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lomé, Togo. *J Int AIDS Soc* 14, 30.
- Dalai, S.C., De Oliveira, T., Harkins, G.W., Kassaye, S.G., Lint, J., Manasa, J., Johnston, E., Katzenstein, D., 2009. Evolution and molecular epidemiology of subtype C HIV-1 in Zimbabwe. *AIDS* 23, 2523–2532.
- Damond, Florence, Worobey, M., Campa, P., Farfara, Isabelle, Colin, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, Françoise, Robertson, David L, Simon, François, 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 666–672.
- Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P J, Essex, M, Desrosiers, R.C., 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228, 1201–1204.
- Das, A., Prashar, V., Mahale, S., Serre, L., Ferrer, J.-L., Hosur, M.V., 2006. Crystal structure of HIV-1 protease in situ product complex and observation of a low-barrier hydrogen bond between catalytic aspartates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18464–18469.
- De Beudrap, P., Thiam, M., Diouf, A., Toure-Kane, Coumba, Ngom-Guèye, N.F., Vidal, Nicole, Mboup, Souleymane, Ndoye, Ibrahim, Sow, Papa S, Delaporte, Eric, For the ANRS 1215 study group, 2012. Risk of virological failure and drug resistance during first and second-line antiretroviral therapy in a 10-year cohort in Senegal: results from the ANRS 1215 cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*
- De Cock, K.M., Crowley, S.P., Lo, Y.-R., Granich, R.M., Williams, B.G., 2009. Preventing HIV transmission with antiretrovirals. *Bull. World Health Organ.* 87, 488–488A.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., Van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* 64, 1207–1216.
- De Mareuil, J., Carre, M., Barbier, P., Campbell, G.R., Lancelot, S., Opi, S., Esquieu, D., Watkins, J.D., Prevot, C., Braguer, D., Peyrot, V., Loret, E.P., 2005. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology* 2, 5.
- De Medeiros, Rùbia Marília, Junqueira, D.M., Matte, M.C.C., Barcellos, N.T., Chies, J.A.B., Matos Almeida, Sabrina Esteves, 2011. Co-circulation HIV-1 subtypes B, C, and CRF31_{BC} in a drug-naïve population from Southernmost Brazil: analysis of primary resistance mutations. *J. Med. Virol.* 83, 1682–1688.
- De Oliveira, T., Deforche, K., Cassol, S., Salminen, Mika, Paraskevis, Dimitris, Seebregts, C., Snoeck, J., Van Rensburg, E.J., Wensing, Annemarie M J, Van de Vijver, D.A., Boucher, Charles A, Camacho, Ricardo, Vandamme, Anne-Mieke, 2005. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 21, 3797–3800.
- De Silva, T.I., Cotten, M., Rowland-Jones, S.L., 2008. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol.* 16, 588–595.
- Deeks, S.G., Lu, J., Hoh, R., Neilands, T.B., Beatty, G., Huang, W., Liegler, T., Hunt, P., Martin, J.N., Kuritzkes, D.R., 2007. Interruption of enfuvirtide in HIV-1 infected adults with incomplete viral suppression on an enfuvirtide-based regimen. *J. Infect. Dis.* 195, 387–391.
- Delaugerre, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.-C., Simon, François, 2011. HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet* 378, 1894.
- Delaugerre, C., Denis, B., Peytavin, G., Palmer, P., Mourez, T., Le Goff, J., Molina, J.-M., Simon, François, 2009. Clinical and resistance consequences of misquantification of plasma and cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in samples from an HIV-1 subtype G-infected patient. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3763–3764.
- Delelis, O., Thierry, S., Subra, F., Simon, Françoise, Malet, I., Alloui, C., Sayon, S., Calvez, Vincent, Deprez, E., Marcelin, Anne-Geneviève, Tchertanov, L., Mouscadet, J.-F., 2010. Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 491–501.
- Depatureaux, A., Charpentier, C., Leoz, M., Unal, G., Damond, Florence, Kfutwah, Anfunbom, Vessière, A., Simon, François, Plantier, J.-C., 2011. Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56, 139–145.
- Derache, A., Maiga, A.-I., Traore, O., Akonde, A., Cisse, M., Jarrousse, B., Koita, V., Diarra, B., Carcelain, G., Barin, Francis, Pizzocolo, C., Pizarro, L., Katlama, C., Calvez, Vincent, Marcelin, Anne-Geneviève, 2008. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 456–463.
- Derache, A., Traore, O., Koita, V., Sylla, A., Tubiana, R., Simon, A., Canestri, A., Carcelain, G., Katlama, C., Calvez, Vincent, Cisse, M., Marcelin, Anne-Geneviève, 2007. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir. Ther. (Lond.)* 12, 123–129.
- Descamps, D., Collin, G., Letourneur, F., Apetrei, C, Damond, F, Loussert-Ajaka, I., Simon, F, Saragosti, S., Brun-Vézinet, F, 1997. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *J. Virol.* 71, 8893–8898.
- Deshpande, A., Jauvin, V., Pinson, P., Jeannot, A.C., Fleury, Herve J, 2009. Phylogenetic analysis of HIV-1 reverse transcriptase sequences from 382 patients recruited in JJ Hospital of Mumbai, India, between 2002 and

2008. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 633–635.
- DeStefano JJ, Mallaber LM, Rodriguez-Rodriguez L, Fay PJ, Bambara RA. Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 1992; 66:6370-8.
- DeStefano JJ, Bambara RA, Fay PJ. The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J Biol Chem* 1994; 269:161-8
- Di Giambenedetto, S, Prosperi, M., Fanti, I, Bruzzone, B., Paolucci, S., Penco, G., Meini, G., Di Biagio, A., Paolini, E., Micheli, V., Meraviglia, P., Castelli, P., Corsi, P., Gonnelli, A., Fabbiani, M., Zazzi, M, De Luca, A, 2011. Update on emergence of HIV-1 resistance to antiretroviral drug classes in an Italian national database: 2007-2009. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1352–1355.
- Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, Coumba, Leye, N., Ngom-Gueye, N.F., Montavon, Céline, Peeters, Martine, Mboup, Souleymane, 2010. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naïve patients from Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 1133–1138.
- Division SIDA/IST, Ministère de la santé et de l'action sociale. Guide de prise en charge de l'infection à VIH/SIDA au Sénégal, version 2009. Page 36-38
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A., Göttlinger, H G, 1994. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 68, 1689–1696.
- Dragic, T, Trkola, A, Thompson, D.A., Cormier, E.G., Kajumo, F.A., Maxwell, E., Lin, S.W., Ying, W., Smith, S.O., Sakmar, T P, Moore, J P, 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5639–5644.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4, e88.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Dumond, J.B., Patterson, K.B., Pecha, A.L., Werner, R.E., Andrews, E., Damle, B., Tressler, R., Worsley, J., Kashuba, A.D.M., 2009. Maraviroc concentrates in the cervicovaginal fluid and vaginal tissue of HIV-negative women. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 546–553.
- Easterbrook, P.J., Smith, M., Mullen, J., O'Shea, S., Chrystie, I., De Ruiter, A., Tatt, I.D., Geretti, A.M., Zuckerman, M., 2010. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc* 13, 4.
- Elul, B., Basinga, P., Nuwagaba-Biribonwoha, H., Saito, S., Horowitz, D., Nash, D., Mugabo, J., Mugisha, V., Rugigana, E., Nkunda, R., Asiimwe, A., 2013. High levels of adherence and viral suppression in a nationally representative sample of HIV-infected adults on antiretroviral therapy for 6, 12 and 18 months in Rwanda. *PLoS ONE* 8, e53586.
- Esbjörnsson, J., Månsson, F., Martínez-Arias, W., Vincic, E., Biague, A.J., Da Silva, Z.J., Fenyö, E.M., Norrgren, H., Medstrand, P., 2010. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease--indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology* 7, 23.
- Eshleman, S.H., Church, J.D., Chen, S., Guay, L.A., Mwatha, A., Fiscus, S.A., Mmiro, F., Musoke, P., Kumwenda, N., Jackson, J.B., Taha, T.E., Hoover, D.R., 2006. Comparison of HIV-1 mother-to-child transmission after single-dose nevirapine prophylaxis among African women with subtypes A, C, and D. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 518–521.
- Etienne, L., Eymard-Duvernay, S., Aghokeng, A., Butel, C., Monleau, M., Peeters, Martine, 2013. Single real-time reverse transcription-PCR assay for detection and quantification of genetically diverse HIV-1, SIVcpz, and SIVgor strains. *J. Clin. Microbiol.* 51, 787–798.
- Etienne, L., Peeters, Martine, 2010. Origine du VIH, une réussite émergente. *Virologie* 14, 171–84.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., Buttò, S., 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanita* 46, 5–14.
- Felsenstein, j, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Feng, J.Y., Anderson, K S, 1999. Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 38, 9440–9448.
- Feng, Y., Wei, H., Hsi, J.H., Xing, H., He, X., Liao, L., Ma, Y., Ning, C., Wang, N., Takebe, Y., Shao, Y., 2013. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF65_cpx) comprised of CRF01_AE and subtypes B and C in western Yunnan, China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*
- Feng, Y.X., Copeland, T.D., Henderson, L.E., Gorelick, R J, Bosche, W.J., Levin, J G, Rein, A., 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces “maturation” of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7577–7581.
- Fitch, W.M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 406–15.
- Fontella, R., Soares, M.A., Schrago, C.G., 2008. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. *AIDS* 22, 2001–2011.
- Fransen, S., Gupta, S., Danovich, R., Hazuda, D., Miller, M., Witmer, M., Petropoulos, C.J., Huang, W., 2009. Loss

- of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. *J. Virol.* 83, 11440–11446.
- Freitas, F.B., Esteves, A., Piedade, J., Parreira, R., 2013. Novel multiregion hybridization assay for the identification of the most prevalent genetic forms of the human immunodeficiency virus type 1 circulating in Portugal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 318–328.
- Gaibelet, G., Planchenault, T., Mazères, S., Dumas, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lopez, A., Lagane, B., Bachelier, F., 2006. CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. *J. Biol. Chem.* 281, 37921–37929.
- Galvin, S.R., Cohen, M.S., 2004. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 33–42.
- 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.
- Gao, F., Robertson, D L., Carruthers, C.D., Morrison, S.G., Jian, B., Chen, Y., Barré-Sinoussi, F., Girard, M., Srinivasan, A., Abimiku, A.G., Shaw, G M, Sharp, P M, Hahn, B H, 1998. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 5680–5698.
- Gao, F., Vidal, N, Li, Y, Trask, S.A., Chen, Y, Kostrikis, L G, Ho, D D, Kim, J., Oh, M.D., Choe, K., Salminen, M, Robertson, D L, Shaw, G M, Hahn, B H, Peeters, M, 2001. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 675–688.
- Gao, F, Yue, L., Robertson, D L, Hill, S.C., Hui, H., Biggar, R.J., Neequaye, A.E., Whelan, T.M., Ho, D D, Shaw, G M, 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* 68, 7433–7447.
- 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.
- García, F., Climent, N., Assoumou, L., Gil, C., González, N., Alcamí, J., León, A., Romeu, J., Dalmau, J., Martínez-Picado, J., Lifson, J., Autran, B., Costagliola, D., Clotet, B., Gatell, J.M., Plana, M., Gallart, T., 2011. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 203, 473–478.
- Garnett, G.P., Becker, S., Bertozzi, S., 2012. Treatment as prevention: translating efficacy trial results to population effectiveness. *Curr Opin HIV AIDS* 7, 157–163.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A., 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156, 171–176.
- Georgiev, I.S., Doria-Rose, N.A., Zhou, T., Kwon, Y.D., Staube, R.P., Moquin, S., Chuang, G.-Y., Louder, M.K., Schmidt, S.D., Altae-Tran, H.R., Bailer, R.T., McKee, K., Nason, M., O'Dell, S., Ofek, G., Pancera, M., Srivatsan, S., Shapiro, L., Connors, M., Migueles, S.A., Morris, L., Nishimura, Y., Martin, M.A., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2013. Delineating antibody recognition in polyclonal sera from patterns of HIV-1 isolate neutralization. *Science* 340, 751–756.
- Ghosh, R.K., Ghosh, S.M., Chawla, S., 2011. Recent advances in antiretroviral drugs. *Expert Opin Pharmacother* 12, 31–46.
- Gill, V.S., Lima, V.D., Zhang, W., Wynhoven, B., Yip, B., Hogg, R.S., Montaner, J.S.G., Harrigan, P Richard, 2010. Improved virological outcomes in British Columbia concomitant with decreasing incidence of HIV type 1 drug resistance detection. *Clin. Infect. Dis.* 50, 98–105.
- Gitti, R.K., Lee, B.M., Walker, J., Summers, M.F., Yoo, S., Sundquist, W.I., 1996. Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273, 231–235.
- Giunta, B., Zhou, Y., Hou, H., Rrapo, E., Fernandez, F., Tan, J., 2008. HIV-1 TAT inhibits microglial phagocytosis of Abeta peptide. *Int J Clin Exp Pathol* 1, 260–275.
- Goethals, O., Clayton, R., Van Ginderen, M., Vereycken, I., Wagemans, E., Geluykens, P., Dockx, K., Strijbos, R., Smits, V., Vos, A., Meersseman, G., Jochmans, D., Vermeire, K., Schols, D., Hallenberger, S., Hertogs, K., 2008. Resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase selected with elvitegravir confer reduced susceptibility to a wide range of integrase inhibitors. *J. Virol.* 82, 10366–10374.
- Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Kao, S., Opi, S., Takeuchi, H., Strebel, Klaus, 2008. HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology* 372, 136–146.
- González-Alba, J.M., Holguín, Africa, García, R., García-Bujalance, S., Alonso, R., Suárez, A., Delgado, R., Cardenoso, L., González, R., García-Bermejo, I., Portero, F., De Mendoza, C., González-Candelas, F., Galán, J.-C., 2011. Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J. Virol.* 85, 10755–10763.
- Götte, M., 2012. The distinct contributions of fitness and genetic barrier to the development of antiviral drug resistance. *Curr Opin Virol* 2, 644–650.
- 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.
- Groom, H.C.T., Anderson, E.C., Dangerfield, J.A., Lever, A.M.L., 2009. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J. Gen. Virol.* 90, 1141–1147.
- Gudmundsdóttir, L., Boström, A.-C., Burton, C., Rosignoli, G., Sandström, E., Hejdeman, B., Wahren, B., Imami, N., Gotch, F., 2008. Long-term increase of CD4+ central memory cells in HIV-1-infected individuals by

therapeutic HIV-1 rgp160 immunization. *Vaccine* 26, 5107–5110.

- Gueudin, M., Leoz, M., Lemée, V., De Oliveira, F., Vessière, A., Kfutwah, Anfumbom, Plantier, J.-C., 2012. A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. *J. Clin. Microbiol.* 50, 831–836.
- Gueudin, M., Plantier, J.-C., Damond, Florence, Roques, Pierre, Maucière, Philippe, Simon, François, 2003. Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 113, 43–49.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Gulick, R.M., Lalezari, J., Goodrich, J., Clumeck, N., DeJesus, E., Horban, Andrzej, Nadler, J., Clotet, B., Karlsson, A., Wohlfeiler, M., Montana, J.B., McHale, M., Sullivan, J., Ridgway, C., Felstead, S., Dunne, M.W., Van der Ryst, E., Mayer, H., 2008. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 359, 1429–1441.
- Guo, F., Cen, S., Niu, M., Yang, Y., Gorelick, Robert J, Kleiman, L., 2007. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA³Lys annealing to viral RNA. *J. Virol.* 81, 11322–11331.
- Gürtler, L G, Hauser, P.H., Eberle, J., Von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L, Tsague, J.M., Kaptue, L., 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* 68, 1581–1585.
- Habekova, M., Takacova, M., Lysy, J., Mokras, M., Camacho, R, Truska, P., Stanekova, D., 2010. Genetic subtypes of HIV type 1 circulating in Slovakia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 1103–1107.
- Hachiya, A., Shimane, K., Sarafianos, Stefan G, Kodama, E.N., Sakagami, Y., Negishi, F., Koizumi, H., Gatanaga, H., Matsuoka, M., Takiguchi, M., Oka, S., 2009. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* 82, 115–121.
- Haidara, A., Chamberland, A., Sylla, M., Aboubacrine, S.A., Cissé, M., Traore, H A, Maiga, M Y, Tounkara, A, Nguyen, V.K., Tremblay, C., Appuyer le Traitement Anti Rétroviral en Afrique de l’Ouest (ATARAO) Group 1, 2010. High level of primary drug resistance in Mali. *HIV Med.* 11, 404–411.
- Halvas, E.K., Aldrovandi, G.M., Balfe, P., Beck, I.A., Boltz, V.F., Coffin, John M, Frenkel, Lisa M, Hazelwood, J.D., Johnson, V.A., Kearney, M., Kovacs, A., Kuritzkes, D.R., Metzner, K.J., Nissley, D.V., Nowicki, M., Palmer, S., Ziermann, R., Zhao, Richard Y, Jennings, C.L., Bremer, J., Brambilla, D., Mellors, J.W., 2006. Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2612–2614.
- Halvas, E.K., Wiegand, A., Boltz, V.F., Kearney, M., Nissley, D., Wantman, M., Hammer, S.M., Palmer, S., Vaida, F., Coffin, John M, Mellors, J.W., 2010. Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment- experienced patients. *J. Infect. Dis.* 201, 672–680.
- Hamel, Donald J, Sankalé, J.-L., Eisen, Geoffrey, Meloni, S.T., Mullins, C., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, Souleymane, Kanki, Phyllis J, 2007. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 1189–1196.
- Hamers, R.L., Sigaloff, K.C.E., Kityo, C., Mugenyi, P., De Wit, T.F.R., 2013. Emerging HIV-1 drug resistance after roll-out of antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. *Curr Opin HIV AIDS* 8, 19–26.
- Hanna, G.J., Lalezari, J., Hellinger, J.A., Wohl, D.A., Nettles, R., Persson, A., Krystal, M., Lin, P., Colonna, R., Grasela, D.M., 2011. Antiviral activity, pharmacokinetics, and safety of BMS-488043, a novel oral small-molecule HIV-1 attachment inhibitor, in HIV-1-infected subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 722–728.
- Hanson, D.L., Adjé-Touré, C., Talla-Nzussouo, N., Eby, P., Borget, M.-Y., Kouadio, L.Y., Celestin, B.E., Tossou, O., Eholie, S., Kadio, A., Chorba, T., Nkengasong, John N, 2009. HIV type 1 drug resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Côte d’Ivoire. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 489–495.
- Hare, S., Vos, A.M., Clayton, R.F., Thuring, J.W., Cummings, M.D., Cherepanov, P., 2010. Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20057–20062.
- Harrigan, P R, Stone, C., Griffin, P., Nájera, I., Bloor, S., Kemp, S., Tisdale, M., Larder, B., 2000. Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J. Infect. Dis.* 181, 912–920.
- 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.
- Hawkins, C.A., Chaplin, Beth, Idoko, J., Ekong, E., Adewole, I., Gashau, W., Murphy, R.L., Kanki, Phyllis, APIN Plus/Harvard PEPFAR Team, 2009. Clinical and genotypic findings in HIV-infected patients with the K65R mutation failing first-line antiretroviral therapy in Nigeria. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52, 228–234.
- Hazuda, D.J., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Jolly, S.M., Wai, J.S., Zhuang, L., Fisher, T.E., Embrey, M., Guare, J.P., Jr, Egbertson, M.S., Vacca, J.P., Huff, J.R., Felock, P.J., Witmer, M.V., Stillmock, K.A., Danovich, R., Grobler, J., Miller, M.D., Espeseth, A.S., Jin, Lixia, Chen, I.-W., Lin, J.H., Kassahun, K., Ellis, J.D., Wong, B.K., Xu, W., Pearson, P.G., Schleif, W.A., Cortese, R., Emimi, E., Summa, V., Holloway, M.K., Young, S.D., 2004. A

- naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11233–11238.
- Hegde, R., Borkow, G., Berchanski, A., Lapidot, A., 2007. Structure-function relationship of novel X4 HIV-1 entry inhibitors - L- and D-arginine peptide-aminoglycoside conjugates. *FEBS J.* 274, 6523–6536.
- Hemelaar, J., 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18, 182–192.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, Saladin, 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25, 679–689.
- Henriet, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J.-C., Marquet, R., 2005. Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* 354, 55–72.
- Herbinger, K.-H., Gerhardt, M., Piyasirisilp, S., Mloka, D., Arroyo, M.A., Hoffmann, O., Maboko, L., Birx, Deborah L, Mmbando, D., McCutchan, Francine E, Hoelscher, M., 2006. Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 599–606.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.
- Hoelscher, M., Dowling, W.E., Sanders-Buell, Eric, Carr, Jean K, Harris, M.E., Thomschke, A., Robb, M.L., Birx, Deborah L, McCutchan, Francine E, 2002. Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *AIDS* 16, 2055–2064.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., Skowronski, J., 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661.
- Huelsenbeck, J P, Ronquist, F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Hughes, G.J., Fearnhill, E., Dunn, D., Lycett, S.J., Rambaut, A., Leigh Brown, A.J., 2009. Molecular phylodynamics of the heterosexual HIV epidemic in the United Kingdom. *PLoS Pathog.* 5, e1000590.
- Huthoff, H., Berkhout, B., 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* 7, 143–157.
- Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., Sugiura, W., 2010. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54, 241–247.
- Iversen, A K, Shafer, R W, Wehrly, K., Winters, M.A., Mullins, J I, Chesebro, B, Merigan, T.C., 1996. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* 70, 1086–1090.
- Jacobson, J.M., Israel, R.J., Lowy, I., Ostrow, N.A., Vassilatos, L.S., Barish, M., Tran, D.N.H., Sullivan, B.M., Ketas, T.J., O'Neill, T.J., Nagashima, K.A., Huang, W., Petropoulos, C.J., Moore, John P, Maddon, P.J., Olson, W.C., 2004. Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 423–429.
- Jaskolski, M., Alexandratos, J.N., Bujacz, G., Wlodawer, A., 2009. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. *FEBS J.* 276, 2926–2946.
- 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. *J. Virol.* 74, 1234–1240.
- Jewkes, R.K., Dunkle, K., Nduna, M., Shai, N., 2010. Intimate partner violence, relationship power inequity, and incidence of HIV infection in young women in South Africa: a cohort study. *Lancet* 376, 41–48.
- John-Stewart, G.C., Nduati, R.W., Rousseau, C.M., Mbori-Ngacha, D.A., Richardson, B.A., Rainwater, S., Panteleeff, D.D., Overbaugh, J., 2005. Subtype C Is associated with increased vaginal shedding of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 192, 492–496.
- Johnson, A.A., Santos, W., Pais, G.C.G., 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. *J. Biol. Chem.* 281, 461–467.
- Johnson, V.A., Calvez, Vincent, Günthard, H.F., Paredes, R., Pillay, Deenan, Shafer, R., Wensing, A.M., Richman, D.D., 2011. 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 19, 156–164.
- Johnson, V.A., Calvez, Vincent, Günthard, H.F., Paredes, R., Pillay, Deenan, Shafer, Robert W, Wensing, A.M., Richman, D.D., 2013. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. *Top Antivir Med* 21, 6–14.
- Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., 2009. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19114–19119.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., Simon, S.M., 2011. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* 13, 394–401.
- Jung, M., Leye, N., Vidal, Nicole, Fargette, D., Diop, H., Toure Kane, C., Gascuel, O., Peeters, Martine, 2012. The origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Senegal. *PLoS ONE* 7, e33579.
- Kane, F., Alary, M., Ndoye, I, Coll, A.M., M'boup, S., Guèye, A., Kanki, P J, Joly, J.R., 1993. Temporary expatriation is related to HIV-1 infection in rural Senegal. *AIDS* 7, 1261–1265.
- Kanki, P J, Hamel, D J, Sankalé, J.L., Hsieh, C. c, Thior, I., Barin, F, Woodcock, S.A., Guèye-Ndiaye, A., Zhang, E., Montano, M., Siby, T., Marlink, R., NDoeye, I., Essex, M.E., MBoup, S., 1999. Human immunodeficiency

- virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J. Infect. Dis.* 179, 68–73.
- Kanki, P J, Travers, K.U., MBoup, S., Hsieh, C.C., Marlink, R G, Gueye-NDiaye, A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., Sankalé, J.L., 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343, 943–946.
- Kantor, R., 2006. Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 594–606.
- Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A.M., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., Wyatt, R.T., 2008. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 143–155.
- Katoh, K., Kuma, K., Miyata, T., Toh, H., 2005. Improvement in the accuracy of multiple sequence alignment program MAFFT. *Genome Inform* 16, 22–33.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Kebe, K., Thiam, M., Diagne Gueye, N.R., Diop, H., Dia, A., Signate Sy, H., Charpentier, C., Belec, L., Mboup, Souleymane, Toure Kane, C., 2013. High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV type 1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 242–249.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Yingying, Bailes, Elizabeth, Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, Frederic, Chen, Yalu, Wain, L.V., Liegeois, Florian, Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, Eric, Brookfield, J.F.Y., Sharp, Paul M, Shaw, George M, Peeters, Martine, Hahn, Beatrice H, 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523–526.
- Keller, P.W., Adamson, C.S., Heymann, J.B., Freed, E.O., Steven, A.C., 2011. HIV-1 maturation inhibitor bevirimat stabilizes the immature Gag lattice. *J. Virol.* 85, 1420–1428.
- Kijak, G.H., Tovanabutra, S., Sanders-Buell, Eric, Watanaveeradej, V., De Souza, M.S., Nelson, K.E., Ketsararat, V., Gulgolgar, V., Wera-arpachai, M., Sriplienchan, S., Khamboonrueng, C., Birx, Deborah L, Robb, M.L., McCutchan, Francine E, 2007. Distinguishing molecular forms of HIV-1 in Asia with a high-throughput, fluorescent genotyping assay, MHAbce v.2. *Virology* 358, 178–191.
- Kils-Hütten, L., Cheynier, R., Wain-Hobson, S, Meyerhans, A., 2001. Phylogenetic reconstruction of intrapatient evolution of human immunodeficiency virus type 1: predominance of drift and purifying selection. *J. Gen. Virol.* 82, 1621–1627.
- Kim, B.C., Ju, M.K., Dan-Chin-Yu, A., Sommer, P., 2009. Quantitative detection of HIV-1 particles using HIV-1 neutralizing antibody-conjugated beads. *Anal. Chem.* 81, 2388–2393.
- Kiwanuka, N., Laeyendecker, O., Quinn, T.C., Wawer, M.J., Shepherd, J., Robb, M., Kigozi, G., Kagaayi, J., Serwadda, D., Makumbi, F.E., Reynolds, S.J., Gray, R.H., 2009. HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS* 23, 2479–2484.
- Kiwanuka, N., Laeyendecker, O., Robb, M., Kigozi, G., Arroyo, M., McCutchan, Francine, Eller, L.A., Eller, M., Makumbi, F., Birx, D., Wabwire-Mangen, F., Serwadda, D., Sewankambo, N.K., Quinn, T.C., Wawer, M., Gray, R., 2008. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 197, 707–713.
- Klein, F., Mouquet, H., Dosenovic, P., Scheid, J.F., Scharf, L., Nussenzweig, M.C., 2013. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science* 341, 1199–1204.
- Kogan, M., Rappaport, J., 2011. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8, 25.
- 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* 256, 1783–1790.
- Krivine, A., Launay, O., Firtion, G., Finkielstejn, L., Jullien, V., Rozenberg, F., Pannier, E., 2009. Does HIV-1 subtype D have a higher risk of vertical transmission than other HIV subtypes? *J. Infect. Dis.* 199, 1553–1554; author reply 1554–1555.
- Kuhmann, S.E., Pugach, P., Kunstman, K.J., Taylor, J., Stanfield, R.L., Snyder, A., Strizki, J.M., Riley, J., Baroudy, B.M., Wilson, I.A., Korber, Bette T, Wolinsky, S.M., Moore, John P, 2004. Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J. Virol.* 78, 2790–2807.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9061–9065.
- Kuritzkes, D.R., Jacobson, J., Powderly, W.G., Godofsky, E., DeJesus, E., Haas, F., Reimann, K.A., Larson, J.L., Yarbough, P.O., Curt, V., Shanahan, W.R., Jr, 2004. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J. Infect. Dis.* 189, 286–291.
- Kutluay, S.B., Bieniasz, P.D., 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog.* 6, e1001200.
- Kwon, J.-A., Yoon, S.-Y., Lee, C.-K., Lim, C.S., Lee, K.N., Sung, H.J., Brennan, C.A., Devare, S.G., 2006. Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination immunoassays. *J. Virol. Methods* 133, 20–26.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., Benkirane, M., 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.

- Lai, A., Riva, C., Marconi, A., Balestrieri, M., Razzolini, F., Meini, G., Vicenti, I., Rosi, A., Saladini, F., Caramma, I., Franzetti, M., Rossini, V., Galli, A., Galli, M., Violin, M., Zazzi, M., Balotta, C., 2010. Changing patterns in HIV-1 non-B clade prevalence and diversity in Italy over three decades. *HIV Med.* 11, 593–602.
- Lal, Renu B, Chakrabarti, S., Yang, Chunfu, 2005. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J. Med. Res.* 121, 287–314.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Larmarange, J., Wade, Abdoulaye S, Diop, Abdou K, Diop, O., Gueye, K., Marra, A., Du Loù, A.D., 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.
- Lataillade, M., Chiarella, J., Kozal, M.J., 2007. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir. Ther. (Lond.)* 12, 563–570.
- Launay, O., 2008. [Antiretroviral therapy: principles for treating HIV infection]. *Presse Med* 37, 1022–1032.
- Laurent, C., Bourgeois, Anke, Faye, Mame Awa, Mougoutou, R., Seydi, M., Gueye, M., Liégeois, F., Kane, Coumba Touré, Butel, C., Mbuagbaw, J., Zekeng, Léopold, Mboup, Souleymane, Mpoudi-Ngolé, E., Peeters, Martine, Delaporte, Eric, 2002. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J. Infect. Dis.* 186, 486–492.
- Laurent, C., Ngom Gueye, N.F., Ndour, C.T., Gueye, Pape Mandoumbé, Diouf, M., Diakhaté, N., Touré Kane, N.C., Lanièce, I., Ndir, A., Vergne, Laurence, Ndoye, Ibrahima, Mboup, Souleymane, Sow, Pape Salif, Delaporte, Eric, 2005. Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38, 14–17.
- Lazzarin, A., Clotet, B., Cooper, D., Reynes, Jacques, Arastéh, K., Nelson, M., Katlama, C., Stellbrink, H.-J., Delfraissy, J.-F., Lange, J., Huson, L., DeMasi, R., Wat, C., Delehanty, J., Drobnès, C., Salgo, M., 2003. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N. Engl. J. Med.* 348, 2186–2195.
- Le Rouzic, E., Benichou, Serge, 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2, 11.
- Lee, C.N., Chen, M.Y., Lin, H.S., Lee, M.C., Luo, C.C., Twu, S.J., Lin, R.Y., Chuang, C.Y., 1998. HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 807–809.
- Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., Vandamme, Anne-Mieke, 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6588–6592.
- Leoz, M., Chaix, Marie-Laure, Delaugerre, C., Rivoisy, C., Meyer, L., Rouzioux, Christine, Simon, François, Plantier, J.-C., 2011. Circulation of multiple patterns of unique recombinant forms B/CRF02_AG in France: precursor signs of the emergence of an upcoming CRF B/02. *AIDS* 25, 1371–1377.
- Leschonsky, B., Ludwig, C., Bieler, K., Wagner, R., 2007. Capsid stability and replication of human immunodeficiency virus type 1 are influenced critically by charge and size of Gag residue 183. *J. Gen. Virol.* 88, 207–216.
- Levin, A., Hayouka, Z., Brack-Werner, R., Volsky, D.J., Friedler, A., Loyter, A., 2009. Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 753–763.
- 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* 225, 840–842.
- Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., Zhao, Richard Y, 2005. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* 15, 923–934.
- Li, Yun, Yang, Liu, Yang, Ling, Chen, D.-Y., Feng, X., Yu, S.-Q., Li, Z.-L., Zeng, Y., 2011. [Anti-adenovirus neutralizing antibodies and Gag-specific cellular immune responses in *Macaca fascicularis* immunized with Ad5-HIVgag]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 25, 413–415.
- Lichterfeld, M., Wöhrmann, A., Schmeisser, N., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., Wyen, C., Schmitz, K., Sauerbruch, T., Rockstroh, J.K., 2003. Superior virological efficacy of ritonavir-boosted protease inhibitor regimens compared to single protease inhibitor therapy. *Eur. J. Med. Res.* 8, 56–60.
- Lihana, R.W., Ssemwanga, D., Abimiku, A., Ndambi, N., 2012. Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. *AIDS Rev* 14, 83–100.
- Liu, S.-L., Mittler, J.E., Nickle, D.C., Mulvania, T.M., Shriner, D., Rodrigo, A.G., Kosloff, B., He, X., Corey, L., Mullins, James I, 2002. Selection for human immunodeficiency virus type 1 recombinants in a patient with rapid progression to AIDS. *J. Virol.* 76, 10674–10684.
- Locatelli, S., Peeters, Martine, 2012. Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS* 26, 659–673.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadhari, D., Kulkarni, S S, Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- Louie, B., Wong, E., Klausner, J.D., Liska, S., Hecht, F., Dowling, T., Obeso, M., Phillips, S.S., Pandori, M.W., 2008. Assessment of rapid tests for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies in recently

- infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1494–1497.
- Low, A., Prada, N., Topper, M., Vaida, F., Castor, D., Mohri, H., Hazuda, D., Muesing, M., Markowitz, Martin, 2009. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4275–4282.
- Lu, J., Deeks, S.G., Hoh, R., Beatty, G., Kuritzkes, B.A., Martin, J.N., Kuritzkes, D.R., 2006. Rapid emergence of enfuvirtide resistance in HIV-1-infected patients: results of a clonal analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 43, 60–64.
- Lu, L., Jia, M., Ma, Yanling, Yang, Li, Chen, Zhiwei, Ho, David D, Jiang, Y., Zhang, Linqi, 2008. The changing face of HIV in China. *Nature* 455, 609–611.
- MacNeil, A., Sarr, Abdoulaye Dieng, Sankalé, J.-L., Meloni, S.T., Mboup, Souleymane, Kanki, Phyllis, 2007. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J. Virol.* 81, 5325–5330.
- Magiorkinis, G., Paraskevis, Dimitrios, Vandamme, Anne-Mieke, Magiorkinis, E., Sypsa, V., Hatzakis, Angelos, 2003. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J. Gen. Virol.* 84, 2715–2722.
- Maiga, A.I., Penugonda, S., Katile, D., Diallo, F., Fofana, D.B., Berzins, B., Maiga, Moussa Youssouffa, Sylla, A., Traore, Hamar Alassane, Marcelin, Anne-Genevieve, Calvez, Vincent, Tounkara, Anatole, Bellosillo, N., Murphy, R., Taiwo, B., 2012. Connection Domain Mutations During Antiretroviral Treatment Failure in Mali: Frequencies and Impact on Reverse Transcriptase Inhibitor Activity. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*.
- Malim, M H, Cullen, B.R., 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6180–6189.
- Malim, Michael H, Emerman, M., 2008. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3, 388–398.
- Marcelin, A.G., Calvez, V, 2007. Résistance du VIH aux inhibiteurs d'entrée. *Virologie* 130–4.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S, Richard, V., Thomas, D., Strebel, K, Benarous, R, 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* 1, 565–574.
- Marinello, J., Marchand, C., Mott, B.T., Bain, A., Thomas, C.J., Pommier, Y., 2008. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. *Biochemistry* 47, 9345–9354.
- Marlink, R., Kanki, P, Thior, I., Travers, K., Eisen, G, Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., Gueye, E.H., 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587–1590.
- Martinez-Cajas, J.L., Pai, N.P., Klein, M.B., Wainberg, Mark A, 2009. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). *J Int AIDS Soc* 12, 11.
- Martinez-Picado, J., Martínez, M.A., 2008. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: a view from the clinic and ex vivo. *Virus Res.* 134, 104–123.
- Marx, P A, Li, Y, Lerche, N.W., Sutjipto, S., Gettie, A., Yee, J.A., Brotman, B.H., Prince, A.M., Hanson, A., Webster, R.G., 1991. Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west African pet sooty mangabey. *J. Virol.* 65, 4480–4485.
- Masquelier, B., Tamalet, C., Montès, B., Descamps, Diane, Peytavin, G., Bocket, L., Wirlden, M., Izopet, J., Schneider, V., Ferré, V., Ruffault, A., Palmer, P., Trylesinski, A., Miller, M., Brun-Vézinet, Françoise, Costagliola, D., 2004. Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir. Ther. (Lond.)* 9, 315–323.
- May, M., Gompels, M., Delpech, V., Porter, K., Post, F., Johnson, M., Dunn, D., Palfreeman, A., Gilson, R., Gazzard, B., Hill, T., Walsh, J., Fisher, M., Orkin, C., Ainsworth, J., Bansi, L., Phillips, A., Leen, C., Nelson, M., Anderson, J., Sabin, C., 2011. Impact of late diagnosis and treatment on life expectancy in people with HIV-1: UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. *BMJ* 343, d6016.
- McColl, D.J., Chen, X., 2010. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral Res.* 85, 101–118.
- McDaid, L.M., Hart, G.J., 2010. Sexual risk behaviour for transmission of HIV in men who have sex with men: recent findings and potential interventions. *Curr Opin HIV AIDS* 5, 311–315.
- Menéndez-Arias, L., 2013. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res.* 98, 93–120.
- Messou, E., Chaix, Marie-Laure, Gabillard, D., Minga, A., Losina, E., Yapo, V., Kouakou, M., Danel, C., Sloan, C., Rouzioux, Christine, Freedberg, K.A., Anglaret, X., 2011. Association between medication possession ratio, virologic failure and drug resistance in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy in Côte d'Ivoire. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56, 356–364.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.
- Metzner, K.J., Bonhoeffer, S., Fischer, M., Karanicolas, R., Allers, K., Joos, B., Weber, R., Hirschel, B., Kostrikis, Leondios G, Günthard, H.F., 2003. Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J. Infect. Dis.* 188, 1433–1443.

- Minin, V.N., Bloomquist, E.W., Suchard, M.A., 2008. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1459–1471.
- Mitchell, R.S., Katsura, C., Skasko, M.A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E.B., Margottin-Goguet, F., Benarous, Richard, Guatelli, J.C., 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* 5, e1000450.
- Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P., Robbiani, M., 2007. Current concepts of HIV transmission. *Curr HIV/AIDS Rep* 4, 29–35.
- Mulky, A., Sarafianos, Stefan G, Jia, Y., Arnold, Eddy, Kappes, J.C., 2005. Identification of amino acid residues in the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase tryptophan-repeat motif that are required for subunit interaction using infectious virions. *J. Mol. Biol.* 349, 673–684.
- Muwonga, J., Edidi, S., Butel, C., Vidal, Nicole, Monleau, M., Okenge, A., Mandjo, J.L., Mukumbi, H., Muyembe, J.J., Mbayo, F., Nzongola, D.K., Delaporte, Eric, Boillot, F., Peeters, Martine, 2011. Resistance to antiretroviral drugs in treated and drug-naïve patients in the Democratic Republic of Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 57 Suppl 1, S27–33.
- Naeger, L.K., Margot, N.A., Miller, M.D., 2002. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2179–2184.
- Nájera, R., Delgado, E., Pérez-Alvarez, L., Thomson, M.M., 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16 Suppl 4, S3–16.
- Nakashima, H., Matsui, T., Harada, S., Kobayashi, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamamoto, N., 1986. Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 933–937.
- Ndembi, N., Hamers, R.L., Sigaloff, K.C.E., Lyagoba, Frederick, Magambo, B., Nanteza, B., Watera, C., Kaleebu, P., Rinke de Wit, T.F., 2011. Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala. *AIDS* 25, 905–910.
- Ndiaye, H.D., Tchiakpe, E., Vidal, Nicole, Ndiaye, O., Diop, Abdou Khoudia, Peeters, Martine, Mboup, Souleymane, Toure-Kane, Coumba, 2013. HIV Type 1 Subtype C Remains the Predominant Subtype in Men Having Sex with Men in Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 1265–1272.
- Ndiaye, H.D., Toure-Kane, Coumba, Vidal, Nicole, Niama, F.R., Niang-Diallo, P.A., Dièye, T., Gaye-Diallo, Aissatou, Wade, Abdoulaye Sidibe, Peeters, Martine, Mboup, Souleymane, 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, 249–252.
- Neher, R.A., Leitner, Thomas, 2010. Recombination rate and selection strength in HIV intra-patient evolution. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000660.
- Neil, S.J.D., Zang, T., Bieniasz, P.D., 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
- Niang, C., Tapsoba, P., Weiss, E., Diagne, M., Niang, Y., Moreau, A., Gomis, D., WADE, A., Seck, K., Castle, C., 2003. «It Rains Stones»: Stigma, Violence and HIV Vulnerability among Men Who Have Sex with Men in Dakar, Senegal. *Culture, Health & Sexuality* 5, 499–512.
- Nikolopoulos, G., Paraskevis, D, Hatzakis, A, 2008. HIV epidemiology in Greece. *Future Microbiol* 3, 507–516.
- Nolan, K.M., Del Prete, G.Q., Jordan, A.P.O., Haggarty, B., Romano, J., Leslie, G.J., Hoxie, J.A., 2009. Characterization of a human immunodeficiency virus type 1 V3 deletion mutation that confers resistance to CCR5 inhibitors and the ability to use aplaviroc-bound receptor. *J. Virol.* 83, 3798–3809.
- Ntemgwa, M.L., D' Aquin Toni, T., Brenner, B.G., Camacho, R.J., Wainberg, Mark A, 2009. Antiretroviral drug resistance in human immunodeficiency virus type 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3611–3619.
- Ogert, R.A., Hou, Y., Ba, L., Wojcik, L., Qiu, P., Murgolo, N., Duca, J., Dunkle, L.M., Ralston, R., Howe, J.A., 2010. Clinical resistance to vicriviroc through adaptive V3 loop mutations in HIV-1 subtype D gp120 that alter interactions with the N-terminus and ECL2 of CCR5. *Virology* 400, 145–155.
- Ohagen, A., Gabuzda, D., 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J. Virol.* 74, 11055–11066.
- OMS. 2012. WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens. Disponible dans: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75829/10661/WHO_HIV_12012.10630_eng.pdf. [Consulté le 16 mai 2013].
- OMS. 2013. Le point 2013 de l'OMS sur le traitement de l'infection à VIH dans le monde Résultats, Impact et Opportunités. Disponible dans le site web: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85328/1/WHO_HIV_2013.9_fre.pdf [Consulté le 16 Aout 2013].
- ONUSIDA. 2012. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012.pp:1-212 [UNAIDS Global AIDS Report web site]. disponible dans: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012JC2434_WorldAIDSday_results_en.pdf. [Consulté le 16 mai 2013].
- Pace, P., Rowley, M., 2008. Integrase inhibitors for the treatment of HIV infection. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11, 471–479.
- Palmer, S., Kearney, M., Maldarelli, F., Halvas, E.K., Bixby, C.J., Bazmi, H., Rock, D., Falloon, J., Davey, R.T., Jr, Dewar, R.L., Metcalf, J.A., Hammer, S., Mellors, J.W., Coffin, John M, 2005. Multiple, linked human

- immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 406–413.
- Pando, M.A., De Salvo, C., Bautista, C.T., Eyzaguirre, L., Carrion, G., Feola, M., Lado, I., Hoffman, M., Biglione, M.M., Carr, Jean K, Montano, S.M., Sanchez, José L, Weissenbacher, M., Avila, M.M., 2008. Human immunodeficiency virus and tuberculosis in Argentina: prevalence, genotypes and risk factors. *J. Med. Microbiol.* 57, 190–197.
- Parikh, U.M., Zelina, S., Sluis-Cremer, N., Mellors, J.W., 2007. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* 21, 1405–1414.
- Peeters, M, Aghokeng, A.F., Delaporte, E, 2010. Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1525–1531.
- Peeters, M, Gueye, A., Mboup, S, Bibollet-Ruche, F, Ekaza, E., Mulanga, C, Ouedrigo, R., Gandji, R., Mpele, P., Dibanga, G., Koumare, B., Saidou, M., Esu-Williams, E., Lombart, J.P., Badombena, W., Luo, N., Vanden Haesevelde, M., Delaporte, E, 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 11, 493–498.
- 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. *J. Virol.* 73, 7368–7375.
- Peeters, M, Sharp, P M, 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 14 Suppl 3, S129–140.
- Peeters, Martine, Toure-Kane, Coumba, Nkengasong, John N, 2003. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 17, 2547–2560.
- Pépin, J., 2013. The origins of AIDS: from patient zero to ground zero. *J Epidemiol Community Health* 67, 473–475.
- Péré, H., Charpentier, C., Mbelesso, P., Dandy, M., Matta, M., Moussa, S., De Dieu Longo, J., Grésenguet, G., Abraham, B., Bélec, L., 2012. Virological response and resistance profiles after 24 months of first-line antiretroviral treatment in adults living in Bangui, Central African Republic. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 315–323.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M, Leonard, J.M., Ho, D D, 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582–1586.
- 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. *EMBO J.* 12, 3551–3558.
- Pettit, S.C., Simsic, J., Loeb, D.D., Everitt, L., Hutchison, C.A., 3rd, Swanstrom, R., 1991. Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. *J. Biol. Chem.* 266, 14539–14547.
- Pillay, V., Ledwaba, J., Hunt, G., Rakgotho, M., Singh, B., Makubalo, L., Bennett, D.E., Puren, A., Morris, L., 2008. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir. Ther. (Lond.)* 13 Suppl 2, 101–107.
- Pizzato, M., Helander, A., Popova, E., Calistri, A., Zamborlini, A., Palù, G., Göttlinger, Heinrich G, 2007. Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6812–6817.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, Florence, Robertson, David L, Simon, François, 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872.
- Plotkin, S.A., 2010. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1055–1065.
- Pond, S.J.K., Ridgeway, W.K., Robertson, R., Wang, Jun, Millar, D.P., 2009. HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1404–1408.
- Popper, S.J., Sarr, A D, Travers, K.U., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S, Essex, M.E., Kanki, P J, 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J. Infect. Dis.* 180, 1116–1121.
- Posada, D, Crandall, K A, 2001. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol. Biol. Evol.* 18, 897–906.
- Procter, J.B., Thompson, J., Letunic, I., Creevey, C., Jossinet, F., Barton, G.J., 2010. Visualization of multiple alignments, phylogenies and gene family evolution. *Nat. Methods* 7, S16–25.
- Prosperi, M.C.F., Mackie, N., Di Giambenedetto, Simona, Zazzi, Maurizio, Camacho, Ricardo, Fanti, Iuri, Torti, C., Sönnnerborg, A., Kaiser, R., Codoñer, F.M., Van Laethem, K., Bansi, L., Van de Vijver, David A M C, Geretti, A.M., De Luca, Andrea, 2011. Detection of drug resistance mutations at low plasma HIV-1 RNA load in a European multicentre cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1886–1896.
- Qadir, M.I., Malik, S.A., 2011. Genetic variation in the HR region of the env gene of HIV: A perspective for resistance to HIV fusion inhibitors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, 57–63.
- Quashie, P.K., Sloan, R.D., Wainberg, Mark A, 2012. Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC Med* 10, 34.
- Quiñones-Mateu, M.E., Albright, J.L., Mas, A., Soriano, V, Arts, E J, 1998. Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 9002–9015.
- Rambaut, A., Posada, David, Crandall, Keith A, Holmes, E.C., 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 52–61.
- Range, F., Noë, R., 2002. Familiarity and dominance relations among female sooty mangabeys in the Taï National

- Park. *Am. J. Primatol.* 56, 137–153.
- Rannala, B., Yang, Z., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43, 304–311.
- Ratner, L., Gallo, R.C., Wong-Staal, F., 1985. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 313, 636–637.
- Redd, A.D., Mullis, C.E., Serwadda, D., Kong, X., Martens, C., Ricklefs, S.M., Tobian, A.A.R., Xiao, C., Grabowski, M.K., Nalugoda, F., Kigozi, G., Laeyendecker, O., Kagaayi, J., Sewankambo, N., Gray, R.H., Porcella, S.F., Wawer, M.J., Quinn, T.C., 2012. The rates of HIV superinfection and primary HIV incidence in a general population in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* 206, 267–274.
- Reeves, J.D., Doms, R.W., 2002. Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* 83, 1253–1265.
- Ren, Jingshan, Nichols, C.E., Chamberlain, Phillip P, Weaver, K.L., Short, Steven A, Chan, Joseph H, Kleim, J.-P., Stammers, David K, 2007. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild-type, Leu100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases. *J. Med. Chem.* 50, 2301–2309.
- Ren, Jingshan, Nichols, C.E., Stamp, A., Chamberlain, Phillip P, Ferris, R., Weaver, K.L., Short, Steven A, Stammers, David K, 2006. Structural insights into mechanisms of non-nucleoside drug resistance for HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 101 or 138. *FEBS J.* 273, 3850–3860.
- Ren, Jingshan, Stammers, David K, 2008. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res.* 134, 157–170.
- Renjifo, B, Chaplin, B, Mwakagile, D, Shah, P., Vannberg, F., Msamanga, G, Hunter, D, Fawzi, W, Essex, M, 1998. Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 635–638.
- Renjifo, Boris, Gilbert, P., Chaplin, Beth, Msamanga, Gernard, Mwakagile, Davis, Fawzi, Wafaie, Essex, Max, 2004. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 18, 1629–1636.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Ganguly, N., Zhang, Linqi, Tamashiro, H., Cooper, D.A., Vun, M.C., Bela, B., Ditangco, R., Van Kinh, N., Bernstein, A., Osmanov, Saladin, Mathieson, B., Kent, S.J., Shao, Y., 2010. Defining the objectives of the AIDS vaccine for Asia network: report of the WHO-UNAIDS/Global HIV vaccine enterprise regional consultation on expanding AIDS vaccine research and development capacity in Asia. *Curr Opin HIV AIDS* 5, 435–452.
- Revillard, J.P., 2001. [Mechanisms of autoimmunity and therapeutic implications]. *Rev Prat* 51, 1528–1533.
- Reynolds, S.J., Sendagire, H., Newell, K., Castelnovo, B., Nankya, I., Kanya, M., Quinn, T.C., Manabe, Y.C., Kambugu, A., 2012. Virologic versus immunologic monitoring and the rate of accumulated genotypic resistance to first-line antiretroviral drugs in Uganda. *BMC Infect. Dis.* 12, 381.
- Robertson, D L, Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J K, Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F, Hahn, B H, Kalish, M.L., Kuiken, C., Learn, G H, Leitner, T, McCutchan, F, Osmanov, S, Peeters, M, Pieniazek, D, Salminen, M, Sharp, P M, Wolinsky, S., Korber, B., 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288, 55–56.
- Rodriguez, M.A., Ding, M., Ratner, D., Chen, Yue, Tripathy, S.P., Kulkarni, Smita S, Chatterjee, R., Tarwater, P.M., Gupta, P., 2009. High replication fitness and transmission efficiency of HIV-1 subtype C from India: Implications for subtype C predominance. *Virology* 385, 416–424.
- Roeth, J.F., Collins, K.L., 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 548–563.
- Romani, B., Engelbrecht, S., Glashoff, R.H., 2010. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 91, 1–12.
- Ronquist, Fredrik, Huelsenbeck, John P, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Roquebert, B., Damond, F, Brun-Vézinet, F, Descamps, D, 2009. [HIV genetic diversity and its consequences]. *Pathol. Biol.* 57, 142–148.
- Roques, P, Robertson, D L, Souquière, S., Damond, F, Ayouba, A, Farfara, I, Depienne, C., Nerrienet, E, Dormont, D., Brun-Vézinet, F, Simon, F, Maucière, P, 2002. Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. *Virology* 302, 259–273.
- Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Loya, S., Levin, A., Armon-Omer, A., Britan, E., Hizi, Amnon, Kotler, M., Friedler, A., Loyter, A., 2007. Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. *J. Biol. Chem.* 282, 15743–15753.
- Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valéa, 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. *J. Virol. Methods* 163, 253–257.
- Saitou, N., Nei, M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Santiago, M.L., Lukasik, M., Kamenya, S., Li, Yingying, Bibollet-Ruche, Frederic, Bailes, Elizabeth, Muller, M.N.,

- Emery, M., Goldenberg, D.A., Lwanga, J.S., Ayouba, Ahidjo, Nerrienet, Eric, McClure, H.M., Heeney, J.L., Watts, D.P., Pusey, A.E., Collins, D.A., Wrangham, R.W., Goodall, J., Brookfield, J.F.Y., Sharp, Paul M, Shaw, George M, Hahn, Beatrice H, 2003. Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *J. Virol.* 77, 7545–7562.
- Santiago, M.L., Rodenburg, Cynthia M, Kamenya, S., Bibollet-Ruche, Frederic, Gao, Feng, Bailes, Elizabeth, Meleth, S., Soong, S.-J., Kilby, J.M., Moldoveanu, Z., Fahey, B., Muller, M.N., Ayouba, Ahidjo, Nerrienet, Eric, McClure, H.M., Heeney, J.L., Pusey, A.E., Collins, D.A., Boesch, C., Wrangham, R.W., Goodall, J., Sharp, Paul M, Shaw, George M, Hahn, Beatrice H, 2002. SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* 295, 465.
- Santos, A.F.A., Lengruher, R.B., Soares, E.A., Jere, A., Sprinz, E., Martinez, A.M.B., Silveira, J., Sion, F.S., Pathak, V.K., Soares, M.A., 2008. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS ONE* 3, e1781.
- Sarafianos, S G, Das, K., Clark, A.D., Jr, Ding, J., Boyer, P L, Hughes, S H, Arnold, E, 1999. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10027–10032.
- Sarkar, R., Sengupta, S., Mullick, R., Singh, N.B., Sarkar, K., Chakrabarti, S., 2009. Implementation of a multiregion hybridization assay to characterize HIV-1 strains detected among injecting drug users in Manipur, India. *Intervirolgy* 52, 175–178.
- Sarnagadharan, M.G., DeVico, A.L., Bruch, L., Schüpbach, J., Gallo, R.C., 1984. HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund* 15, 301–308.
- Sax, P.E., 2007. FDA approval: maraviroc. *AIDS Clin Care* 19, 75.
- Schafer, J.J., Short, W.R., 2012. Rilpivirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the management of HIV-1 infection: a systematic review. *Antivir. Ther. (Lond.)* 17, 1495–1502.
- Schiller, D.S., Youssef-Bessler, M., 2009. Etravirine: a second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clin Ther* 31, 692–704.
- Schim van der Loeff, M.F., Aaby, P, 1999. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS* 13 Suppl A, S69–84.
- Schindler, M., Münch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, Frederic, Müller-Trutwin, Michaela C, Novembre, F.J., Peeters, Martine, Courgnaud, V., Bailes, Elizabeth, Roques, Pierre, Sodora, Donald L, Silvestri, G., Sharp, Paul M, Hahn, Beatrice H, Kirchhoff, F., 2006. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125, 1055–1067.
- Semaille, C., Barin, Francis, Cazein, Francoise, Pillonel, J., Lot, F., Brand, D., Plantier, J.-C., Bernillon, P., Le Vu, S., Pinget, R., Desenclos, J.-C., 2007. Monitoring the dynamics of the HIV epidemic using assays for recent infection and serotyping among new HIV diagnoses: experience after 2 years in France. *J. Infect. Dis.* 196, 377–383.
- Shafer, Robert W, Rhee, S.-Y., Pillay, Deenan, Miller, V., Sandstrom, P., Schapiro, J.M., Kuritzkes, D.R., Bennett, D., 2007. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 21, 215–223.
- Shafer, Robert W, Schapiro, J.M., 2005. Drug resistance and antiretroviral drug development. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 817–820.
- Shafer, Robert W, Schapiro, J.M., 2008. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 10, 67–84.
- Shen, C., Craig, J., Ding, M., Chen, Yue, Gupta, P., 2011. Origin and dynamics of HIV-1 subtype C infection in India. *PLoS ONE* 6, e25956.
- Shriner, D., Rodrigo, A.G., Nickle, D.C., Mullins, James I, 2004. Pervasive genomic recombination of HIV-1 in vivo. *Genetics* 167, 1573–1583.
- Sigaloff, K.C.E., Hamers, R.L., Wallis, C.L., Kityo, C., Siwale, M., Ive, P., Botes, M.E., Mandaliya, Kishor, Wellington, M., Osibogun, A., Stevens, W.S., Van Vugt, M., De Wit, T.F.R., PharmAccess African Studies to Evaluate Resistance (PASER), 2011. Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two arguments for viral load monitoring in Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 58, 23–31.
- Simon, D., Béria, J.U., Tietzmann, D.C., Carli, R. de, Stein, A.T., Lunge, V.R., 2010. [Prevalence of HIV-1 subtypes in patients of an urban center in Southern Brazil]. *Rev Saude Publica* 44, 1094–1101.
- Simon, F, Maucière, P, Roques, P, Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M C, Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F, Brun-Vézinet, F, 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1032–1037.
- Singer, D.E., Bautista, C.T., O’Connell, R.J., Sanders-Buell, Eric, Agan, B.K., Kijak, G.H., Hakre, S., Sanchez, Jose L, Sateren, W.B., McCutchan, Francine E, Michael, N.L., Scott, P.T., 2010. HIV infection among U.S. Army and Air Force military personnel: sociodemographic and genotyping analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 889–894.
- Sista, P.R., Melby, T., Davison, D., Jin, Lei, Mosier, S., Mink, M., Nelson, E.L., DeMasi, R., Cammack, Nick, Salgo, M.P., Matthews, T.J., Greenberg, Michael L, 2004. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* 18, 1787–1794.
- Smith, S.M., Christian, D., De Lame, V., Shah, U., Austin, L., Gautam, R., Gautam, A., Apetrei, Cristian, Marx, Preston A, 2008. Isolation of a new HIV-2 group in the US. *Retrovirology* 5, 103.
- Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus research.*

- Somi, G.R., Kibuka, T., Diallo, K., Tuhuma, T., Bennett, D.E., Yang, Chunfu, Kagoma, C., Lyamuya, E.F., Swai, R.O., Kassim, S., 2008. Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antivir. Ther. (Lond.)* 13 Suppl 2, 77–82.
- Song, H., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Sato, H., Levy, Jay A, Shioda, T., 2007. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. *J. Virol.* 81, 7280–7285.
- Ssemwanga, D., Ndemi, N., Lyagoba, Fred, Bukenya, J., Seeley, J., Vandepitte, J., Grosskurth, H., Kaleebu, 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, 357–365.
- Stellbrink, H.-J., 2009. Raltegravir in the management of HIV-infected patients. *Drug Des Devel Ther* 2, 281–288.
- Stoddard, S.T., Morrison, A.C., Vazquez-Prokopec, G.M., Paz Soldan, V., Kochel, T.J., Kitron, U., Elder, J.P., Scott, T.W., 2009. The role of human movement in the transmission of vector-borne pathogens. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e481.
- Stove, V., Van de Walle, I., Naessens, E., Coene, E., Stove, C., Plum, J., Verhasselt, B., 2005. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J. Virol.* 79, 11422–11433.
- Studier, J.A., Keppler, K.J., 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol. Biol. Evol.* 5, 729–731.
- Sullivan, P.S., Do, A.N., Ellenberger, D., Pau, C.P., Paul, S., Robbins, K., Kalish, M., Storck, C., Schable, C.A., Wise, H., Tetteh, C., Jones, J.L., McFarland, J., Yang, C, Lal, R B, Ward, J.W., 2000. Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States. *J. Infect. Dis.* 181, 463–469.
- Takehisa, J., Kraus, M.H., Ayouba, Ahidjo, Bailes, Elizabeth, Van Heuverswyn, F., Decker, J.M., Li, Yingying, Rudicell, R.S., Learn, Gerald H, Neel, C., Ngole, E.M., Shaw, George M, Peeters, Martine, Sharp, Paul M, Hahn, Beatrice H, 2009. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J. Virol.* 83, 1635–1648.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, Masatoshi, Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tang, S., Murakami, T., Cheng, N., Steven, A.C., Freed, E.O., Levin, Judith G, 2003. Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants containing cores with abnormally high levels of capsid protein and virtually no reverse transcriptase. *J. Virol.* 77, 12592–12602.
- Tatem, A.J., Rogers, D.J., Hay, S.I., 2006. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv. Parasitol.* 62, 293–343.
- Tebit, D.M., Arts, Eric J, 2011. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 11, 45–56.
- Teixeira, D., Munerato, P., Komninakis, S.C.V., Fusuma, E.E., Janini, L.M., Sucupira, M.C.A., Diaz, R.S., 2010. The detection of in vivo and in vitro HIV type 1 B/F profiles in Brazil using a real-time PCR assay for five HIV type 1 genomic regions. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 981–990.
- Thiam, M., Diop-Ndiaye, H., Diouf, A.D., Vidal, Nicole, Ndiaye, O., Ndiaye, I., Ngom-Gueye, N.F., Diallo, S., Diongue, O.D., Camara, M., Seck, A., Mboup, Souleymane, Toure-Kane, Coumba, 2013. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. *J. Clin. Microbiol.* 51, 578–584.
- Thomas, J.A., Gorelick, Robert J, 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* 134, 39–63.
- Thompson, M.A., Aberg, J.A., Hoy, J.F., Telenti, A., Benson, C., Cahn, P., Eron, Joseph J, Günthard, H.F., Hammer, S.M., Reiss, P., Richman, D.D., Rizzardini, G., Thomas, D.L., Jacobsen, D.M., Volberding, P.A., 2012. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 308, 387–402.
- Thomson, M.M., Fernández-García, A., 2011. Phylogenetic structure in African HIV-1 subtype C revealed by selective sequential pruning. *Virology* 415, 30–38.
- Thoulouze, M.I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., Alcover, A., 2006. Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24, 547–561.
- Tienen, C. van, Van der Loeff, M.S., Zaman, S.M.A., Vincent, T., Sarge-Njie, R., Peterson, I., Leligdowicz, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Aaby, Peter, Whittle, H., 2010. Two distinct epidemics: the rise of HIV-1 and decline of HIV-2 infection between 1990 and 2007 in rural Guinea-Bissau. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 53, 640–647.
- Toni, T.D., Masquelier, B., Lazaro, E., Dore-Mbami, M., Ba-Gomis, F.-O., Téa-Diop, Y., Kouakou, K., Diby, J., Sia, E., Soppi, S., Essien, S., Schrive, M.-H., Pinson, P., Chenal, H., Fleury, Hervé J, 2005. Characterization of nevirapine (NVP) resistance mutations and HIV type 1 subtype in women from Abidjan (Côte d’Ivoire) after NVP single-dose prophylaxis of HIV type 1 mother-to-child transmission. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 1031–1034.
- Toure-Kane, C, Montavon, C, Faye, M A, Gueye, P M, Sow, P S, Ndoeye, I, Gaye-Diallo, A, Delaporte, E, Peeters, M, Mboup, S, 2000. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 603–609.

- Tozzi, V., Corpolongo, A., Bellagamba, R., Narciso, P., 2005. Managing patients with sexual transmission of drug-resistant HIV. *Sex Health* 2, 135–142.
- Tozzi, V., Zaccarelli, M., Bonfigli, S., Lorenzini, P., Liuzzi, G., Trotta, M.P., Forbici, F., Gori, C., Bertoli, A., Bellagamba, R., Narciso, P., Perno, C.F., Antinori, A., 2006. Drug-class-wide resistance to antiretrovirals in HIV-infected patients failing therapy: prevalence, risk factors and virological outcome. *Antivir. Ther. (Lond.)* 11, 553–560.
- Travers, S.A.A., Clewley, J.P., Glynn, J.R., Fine, P.E.M., Crampin, A.C., Sibande, F., Mulawa, D., McInerney, J.O., McCormack, G.P., 2004. Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 78, 10501–10506.
- Tsamis, F., Gavrillov, S., Kajumo, F., Seibert, C., Kuhmann, S., Ketas, T., Trkola, Alexandra, Palani, A., Clader, J.W., Tagat, J.R., McCombie, S., Baroudy, B., Moore, John P, Sakmar, Thomas P, Dragic, Tatjana, 2003. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.* 77, 5201–5208.
- Tsibris, A.M.N., Sagar, M., Gulick, R.M., Su, Z., Hughes, M., Greaves, W., Subramanian, M., Flexner, C., Giguel, F., Leopold, K.E., Coakley, E., Kuritzkes, D.R., 2008. In vivo emergence of vicriviroc resistance in a human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected subject. *J. Virol.* 82, 8210–8214.
- Tuaillon, E., Gueudin, M., Lemée, V., Gueit, I., Roques, Pierre, Corrigan, G.E., Plantier, J.-C., Simon, François, Braun, J., 2004. Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 37, 1543–1549.
- Tully, D.C., Wood, C., 2010. Chronology and evolution of the HIV-1 subtype C epidemic in Ethiopia. *AIDS* 24, 1577–1582.
- UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, Dolling, D., Sabin, C., Delpéch, V., Smit, Erasmus, Pozniak, Anton, Asboe, D., Brown, A.L., Churchill, D., Williams, I., Geretti, A.M., Phillips, A., Mackie, N., Murphy, G., Castro, H., Pillay, Deenan, Cane, P., Dunn, D., Dolling, D., 2012. Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study. *BMJ* 345, e5253.
- UNAIDS. 2012. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012.pp:1-212 [UNAIDS Global AIDS Report web site]. Available from: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012J_C2434_WorldAIDSday_results_en.pdf. [consulté le 16/05/2013].
- Valer, L., Martín-Carbonero, L., De Mendoza, C., Corral, A., Soriano, Vincent, 2004. Predictors of selection of K65R: tenofovir use and lack of thymidine analogue mutations. *AIDS* 18, 2094–2096.
- Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptué, L., Gürtler, Lutz 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 Res. Hum. Retroviruses* 26, 109–115.
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptué, L., Ndembi, N., Gürtler, L., Devare, S., Brennan, C.A., 2011. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J. Virol.* 85, 1403–1407.
- Van de Vijver, D A M C, Wensing, A M J, Åsjö, B., Bruckova, M., Jorgensen, L.B., Camacho, R, Horban, A, Linka, M., Lazanas, M., Loveday, C, MacRae, E, Nielsen, C, Paraskevis, D, Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E, Ruiz, L, Schmit, J-C, Stanczak, G, Stanojevic, M, Vandamme, A-M, Vercauteren, J., Zazzi, M, Bachelier, L., Lecocq, P., Villacian, J., Boucher, C.A.B., 2010. HIV-1 drug-resistance patterns among patients on failing treatment in a large number of European countries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 19, 3–9.
- Van Griensven, F., De Lind van Wijngaarden, J.W., 2010. A review of the epidemiology of HIV infection and prevention responses among MSM in Asia. *AIDS* 24 Suppl 3, S30–40.
- Van Heuverswyn, F., Li, Yingying, Neel, C., Bailes, Elizabeth, Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, Florian, Bienvenue, Y., Ngolle, E.M., Sharp, Paul M, Shaw, George M, Delaporte, Eric, Hahn, Beatrice H, Peeters, Martine, 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444, 164.
- Vasan, A., Renjifo, Boris, Hertzmark, E., Chaplin, Beth, Msamanga, Gernard, Essex, Max, Fawzi, Wafaie, Hunter, David, 2006. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin. Infect. Dis.* 42, 843–852.
- Vázquez-Valls, E., Escoto-Delgadillo, M., López-Márquez, F.C., Castellero-Manzano, M., Echegaray-Guerrero, E., Bitzer-Quintero, O.K., Kobayashi-Gutiérrez, A., Torres-Mendoza, B.M., 2010. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Mexico: emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 777–781.
- Véras, N.M.C., Gray, R.R., Brígido, L.F. de M., Rodrigues, R., Salemi, M., 2011. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. *J. Gen. Virol.* 92, 1698–1709.
- Vergne, L, Peeters, M, Mpoudi-Ngole, E, Bourgeois, A, Liegeois, F, Toure-Kane, C, Mboup, S, Mulanga-Kabeya, C., Saman, E., Jourdan, J., Reynes, J, Delaporte, E, 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3919–3925.
- Vergne, Laurence, Bourgeois, Anke, Mpoudi-Ngole, Eitel, Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, Florian, Laurent, C., Butel, C., Zekeng, Léopold, Delaporte, Eric, Peeters, Martine, 2003. Biological and genetic characteristics 159

of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* 310, 254–266.

- Vergne, Laurence, Diagbouga, S., Kouanfack, C., Aghokeng, A., Butel, C., Laurent, C., Noumssi, N., Tardy, M., Sawadogo, A., Drabo, J., Hien, H., Zekeng, Léopold, Delaporte, Eric, Peeters, Martine, 2006. HIV-1 drug-resistance mutations among newly diagnosed patients before scaling-up programmes in Burkina Faso and Cameroon. *Antivir. Ther. (Lond.)* 11, 575–579.
- Vessièrè, A., Nerrienet, Eric, Kfütwah, A., Menu, E., Tejiokem, M., Pinson-Recordon, P., Barré-Sinoussi, Françoise, Fleury, H., Ayouba, Ahidjo, 2006. HIV-1 pol gene polymorphism and antiretroviral resistance mutations in drug-naïve pregnant women in Yaoundé, Cameroon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 256–258.
- Vessièrè, A., Rousset, D., Kfütwah, Anfumbom, Leoz, M., Depatureaux, A., Simon, François, Plantier, J.-C., 2010. Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 53, 107–110.
- Vidal, N, Mulanga, C, Bazepeo, S Edidi, Lepira, F., Delaporte, E, Peeters, M, 2006. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 182–187.
- Vidal, N, Peeters, M, Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., Delaporte, E, 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* 74, 10498–10507.
- Vidal, Nicole, Bazepeo, Samuel Edidi, Mulanga, Claire, Delaporte, Eric, Peeters, Martine, 2009. Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26_A5U. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 823–832.
- Vidal, Nicole, Diop, H., Montavon, Céline, Butel, C., Bosch, S., Ngole, E.M., Touré-Kane, C., Mboup, Souleymane, Delaporte, Eric, Peeters, Martine, 2013. A novel multiregion hybridization assay reveals high frequency of dual inter-subtype infections among HIV-positive individuals in Cameroon, West Central Africa. *Infect. Genet. Evol.* 14, 73–82.
- Vinogradova, A., Gafurova, E., Muñoz-Nieto, M., Rakhmanova, A., Osmanov, Saladin, Thomson, M.M., 2010. Short communication: Molecular epidemiology of HIV type 1 in the Republic of Dagestan, Russian Federation: virtually uniform circulation of subtype A, former Soviet Union variant, with predominance of the V77I(PR) subvariant. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 395–400.
- Wade, Abdoulaye S, Larmarange, J., Diop, Abdou K, Diop, O., Gueye, K., Marra, A., Sene, A., Enel, C., Niang Diallo, P., Toure Kane, N.C., Mboup, Souleymane, Desgrées-du-Lou, A., 2010. Reduction in risk-taking behaviors among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and other STIs. ELIHoS Project, ANRS 12139. *AIDS Care* 22, 409–414.
- Wade, Abdoulaye Sidibe, Kane, Coumba Toure, Diallo, P.A.N., Diop, Abdou Khoudia, Gueye, K., Mboup, Souleymane, Ndoye, Ibrahima, Lagarde, E., 2005. HIV infection and sexually transmitted infections among men who have sex with men in Senegal. *AIDS* 19, 2133–2140.
- Wagner, T.A., Frenkel, L M, 2006. Clinical Significance of HIV-1 Drug Resistance Mutations: Testing for HIV-1 Drug Resistance. *Laboratory Medicine* 37, 554–561.
- Wainberg, Mark A, Albert, Jan, 2010. Can the further clinical development of bevirimat be justified? *AIDS* 24, 773–774.
- Wainberg, Mark A, Brenner, B.G., 2012. The Impact of HIV Genetic Polymorphisms and Subtype Differences on the Occurrence of Resistance to Antiretroviral Drugs. *Mol Biol Int* 2012, 256982.
- Wainberg, Mark A, Moisi, D., Oliveira, M., Toni, T.D., Brenner, B.G., 2011. Transmission dynamics of the M184V drug resistance mutation in primary HIV infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2346–2349.
- Walter, B.L., Armitage, A.E., Graham, S.C., De Oliveira, T., Skinhøj, P., Jones, E.Y., Stuart, David I, McMichael, A.J., Chesebro, Bruce, Iversen, Astrid Kn, 2009. Functional characteristics of HIV-1 subtype C compatible with increased heterosexual transmissibility. *AIDS* 23, 1047–1057.
- Wang, S., Nie, J., Wang, Y., 2011. Comparisons of the genetic and neutralization properties of HIV-1 subtype C and CRF07/08_BC env molecular clones isolated from infections in China. *Virus Res.* 155, 137–146.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., Jones, K.A., 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451–462.
- Wensing, Annemarie M J, Van de Vijver, D.A., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, Claudia, Boeri, E., Camacho, Ricardo, Chaix, Maire-Laure, Costagliola, D., De Luca, Andrea, Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, Angelos, Hemmer, R., Hoepelman, A., Horban, Andrzej, Korn, K., Kücherer, C., Leitner, Thomas, Loveday, Clive, MacRae, Eilidh, Maljkovic, I., De Mendoza, C., Meyer, L., Nielsen, Claus, Op de Coul, E.L., Ormaasen, V., Paraskevis, Dimitris, Perrin, L., Puchhammer-Stöckl, Elisabeth, Ruiz, Lidia, Salminen, Mika, Schmit, Jean-Claude, Schneider, F., Schuurman, Rob, Soriano, Vincent, Stanczak, Grzegorz, Stanojevic, Maja, Vandamme, Anne-Mieke, Van Laethem, K., Violin, Michela, Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, Maurizio, Boucher, Charles A, 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J. Infect. Dis.* 192, 958–966.
- Wheeler, W.H., Ziebell, R.A., Zabina, H., Pieniazek, Danuta, Prejean, J., Bodnar, U.R., Mahle, K.C., Heneine, W., Johnson, J.A., Hall, H.I., 2010. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006. *AIDS* 24, 1203–1212.

- Williams, B., Wood, R., Dukay, V., Delva, W., Ginsburg, D., Hargrove, J., Stander, M., Sheneberger, R., Montaner, J., Welte, A., 2011. Treatment as prevention: preparing the way. *J Int AIDS Soc* 14 Suppl 1, S6.
- Wirachsilp, P., Kantakamalakul, W., Foongladda, S., Chuenchitra, T., Kohriangudom, S., Athipanyasilp, N., Tanprasertsuk, S., Gasitrong, M., Sutthent, R., 2007. Surveillance of subtype and genetic variation of the circulating strains of HIV-1 in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 814–827.
- Witvrouw, M., Van Maele, B., Vercammen, J., Hantson, A., Engelborghs, Y., De Clercq, E., Pannecouque, C., Debyser, Z., 2004. Novel inhibitors of HIV-1 integration. *Curr. Drug Metab.* 5, 291–304.
- Woodman, Z., Mlisana, K., Treurnicht, F., Abrahams, M.-R., Thebus, R., Karim, S.A., Williamson, C., 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, 1167–1172.
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D.E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.-J., Kabongo, J.-M.M., Kalengayi, R.M., Van Marck, E., Gilbert, M.T.P., Wolinsky, S.M., 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455, 661–664.
- Worobey, M., Santiago, M.L., Keele, B.F., Ndjango, J.-B.N., Joy, J.B., Labama, B.L., Dhed'A, B.D., Rambaut, A., Sharp, Paul M, Shaw, George M, Hahn, Beatrice H, 2004. Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature* 428, 820.
- Wright, E., Mugaba, S., Grant, P., Parkes-Ratanshi, R., Van der Paal, L., Grosskurth, H., Kaleebu, P., 2011. Coreceptor and cytokine concentrations may not explain differences in disease progression observed in HIV-1 clade A and D infected Ugandans. *PLoS ONE* 6, e19902.
- Xu, L., Pozniak, A., Wildfire, A., Stanfield-Oakley, S.A., Mosier, S.M., Ratcliffe, D., Workman, J., Joall, A., Myers, R., Smit, E, Cane, P.A., Greenberg, M L, Pillay, D, 2005. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1113–1119.
- Yamaguchi, J., Coffey, R., Vallari, A., Ngansop, C., Mbanya, D., Ndembu, N., Kaptué, L., Gürtler, Lutz G, Bodelle, P., Schochetman, G., Devare, S.G., Brennan, C.A., 2006. Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 83–92.
- Yao, X., Chong, H., Zhang, C., Qiu, Z., Qin, B., Han, R., Waltersperger, S., Wang, M., He, Y., Cui, S., 2012. Structural Basis of Potent and Broad HIV-1 Fusion Inhibitor CP32M. *J. Biol. Chem.* 287, 26618–26629.
- Ye, J., Yu, S., Lu, H., Wang, W., Xin, R., Zeng, Y., 2012. Genetic diversity of HIV type 1 isolated from newly diagnosed subjects (2006-2007) in Beijing, China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 119–123.
- Yebra, G., De Mulder, M., Del Romero, J., Rodríguez, C., Holguín, A, 2010. HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res.* 85, 409–417.
- Youree, B.E., D'Aquila, Richard T, 2002. Antiretroviral resistance testing for clinical management. *AIDS Rev* 4, 3–12.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., Yu, X.-F., 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056–1060.
- Zeh, C., Oyaro, B., Vandenhoudt, H., Amornkul, P., Kasembeli, A., Bondo, P., Mwaengo, D., Thomas, T.K., Hart, C., Laserson, K.F., Ondo, P., Nkengasong, J N, 2011. Performance of six commercial enzyme immunoassays and two alternative HIV-testing algorithms for the diagnosis of HIV-1 infection in Kisumu, Western Kenya. *J. Virol. Methods* 176, 24–31.
- Zhang, D., Caliendo, A.M., Eron, J J, DeVore, K.M., Kaplan, J.C., Hirsch, M.S., D'Aquila, R T, 1994. Resistance to 2',3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 282–287.
- Zhang, J, Tang, L.Y., Li, T., Ma, Y, Sapp, C.M., 2000. Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J. Virol.* 74, 2313–2322.
- Zhang, Jing, Kang, D., Lin, B., Sun, X., Fu, J., Bi, Z., Nkengasong, John N, Yang, Chunfu, 2012. HIV Type 1 Virological Response and Prevalence of HIV Type 1 Drug Resistance Among Patients Receiving Antiretroviral Therapy, Shandong, China. *AIDS research and human retroviruses.*
- Zhao, Richard Yuqi, Bukrinsky, M., Elder, R.T., 2005. HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian J. Med. Res.* 121, 270–286.
- Zhou, M., Deng, L., Kashanchi, F., Brady, J.N., Shatkin, A.J., Kumar, A., 2003. The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12666–12671.
- Zhu, T., Korber, B T, Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P M, Ho, D D, 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594–597.