

LISTE DES ABREVIATIONS

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et des hépatites virales
APV	Amprenavir
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ARN _{t3} ^{Lys}	ARN de transfert de la lysine
ART	Antiretroviral Therapy
ARV	Antirétroviral
ATZ	Atazanavir
AZT	Zidovudine
BAF	Barrier-to-Autointegration Factor
CA	Capside
CCR5	CC chemokine Receptor type 5 (Récepteur de chimiokines 5)
CD4	Cluster of differentiation 4 (Protéine de differentiation 4)
CD8	Cluster of differentiation 8 (Protéine de differentiation 8)
CDC	Center Disease Control
Cdk9	Cyclin-dependent kinase 9 (kinase dépendante de la cycline 9)
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CI	Concentration Inhibitrice
CLIP	Coupled AmpLIfication and sequencing steP
CMH	Complexe majeur d'Histocompatibilité
coll.	Collaborateurs
CRF	Circulating Recombinant Form
CV	Charge Virale
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4 (récepteur de chimiokines 4)
D4t	Stavudine
DBS	Dried Blood Spot
DCI	Dénomination Commune Internationale

	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-Integrin
DC-SIGN	
DCTRTIs	Delayed Chain Terminator RT Inhibitor
ddI	Didanosine
DIS	Dimerization Signal
DLV	Delavirdine
dNTP	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DRV	Darunavir
EDS	Enquêtes Démographiques et de Santé
EFV	Efavirenz
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENF	Enfurvitide (T20)
env	Enveloppe
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ETV	Etravirine
FDA	Food and Drug Administration
Fos-APV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabine
<i>gag</i>	group-specific antigen
gp	Glycoprotéine
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HDAC	histone deacetylase
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMA	Heteroduplex Mobility Assay
HR1/HR2	Heptad Repeat Region 1/2
HRP-2	Hepatoma-derived growth factor related protein 2
HSH	Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes
HTA	Heteroduplex Tracking Assay
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic Virus 1</i>
IAS	International AIDS Society
IDV	Indinavir

IN	Intégrase
INNTI	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INTI	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP	Inhibiteurs de Protéase
IRD	Institut de Recherche pour le Réveloppement
ISAARV	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
kDa	Kilodalton
LAV	<i>Lymphadenopathy Associated Virus,</i>
LBV	Laboratoire de Bactériologie-Virologie
LMRTIs	Lethal Mutagenesis RT Inhibitor
LPV/r	lopinavir/ritonavir
LT CD4	Lymphocyte T CD4
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MHA	Multi-region Hybridization Assay
MLV	Murine Leukemia Virus
MPER	Membrane-Proximal External Region
MRV	Maraviroc
MSM	Men who have Sex with Men
NC	Nucléocapside
<i>nef</i>	negative expression factor
NES	Nuclear Export Sequence
NK	Natural Killer
NVP	Nevirapine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
PBMC	Peripherical Blood Mononuclear Cells
PBS	Primer Binding Site
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Pre-Integration Complex
<i>pol</i>	Polymerase
PPT	Polypurine Tract
PR	Protéase

Pr160Gag-Pol	Polyprotéine Gag –Pol
Pr55 ^{Gag}	Polyprotéine Gag
QIG	Quotient d’Inhibition Génotypique
RARS	Réseau Africain de Recherche sur le SIDA
RDC	République Démocratique du Congo
RE	Reticulum Endoplasmique
<i>rev</i>	regulator of expression virus
RNase H	Ribonucléase H, enzyme de degradation de l’ARN
RPV	Rilpivirine
RRE	Rev Responsive Element
RT	Reverse Transcription
RTC	Reverse Transcription Complexe
RTV	Ritonavir
RVA	Recombinant Virus Assay
RVG	Raltégravir
SD	Splice Donor
SGA	Single Genom Amplification
SGS	Single Genom Sequencing
SIDA	Syndrome d’ImmunoDéficience Acquise
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SQV	Saquinavir
SU	Surface
TAMs	Thymidine Analog Mutations
TAR	Trans-Activation Responsive region
TARV	Traitemen Antirétroviral
<i>tat</i>	trans-activator of transcription
TDF	Tenofovir
TDRTIs	Translocation-Defective RT Inhibitor
TI	Transcriptase Inverse
TIF	Transcription Intermediary Factor
TM	Transmembranaire
TPV	Tipranavir
UMI	Unité Mixte Internationale

UNAIDS	United Nations Programme on HIV/AIDS
URF	Unique Recombinant Form
USA	United States of America
<i>vif</i>	virion infectivity factor
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
VIH-1	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1</i>
VIH-2	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2</i>
<i>vpr</i>	viral protein R
<i>vpu</i>	viral protein U
<i>vpx</i>	viral protein X
WANETAM	West African Network of Excellence for TB, AIDS and Malaria
WAPHIR	West African Platform for HIV Intervention Research
WHO	World Health Organization

LISTE DES ACIDES AMINES

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

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Relation phylogénétique entre les SIVscpz, SIVgor et VIH-1 (Van Heuverswyn et coll., 2007).....	6
Figure 2 : Arbre phylogénétique des VIH-1 et des SIVcpz et SIVgor (Plantier et coll., 2009).	7
Figure 3 : Arbre phylogénétique des différents groupes de VIH-2 (gauche) et leur distribution géographique (droite) (Etienne et Peeters, 2010).	8
Figure 4 : La particule virale du VIH-1 (Coffin et coll., 1997).....	11
Figure 5 : Schéma du génome VIH-1 (Costin et coll., 2007).....	12
Figure 6 : Schéma du LTR 5' du provirus (Freed et coll., 2001).....	13
Figure 7 : Schéma du leader RNA du provirus (Berkhout, 1996).....	13
Figure 8 : Organisation du gène gag (Ono et coll., 2009)	15
Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 (Adamson, 2012)	18
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la transcriptase inverse du VIH-1 (Sarafianos et coll., 2009).....	19
Figure 11 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH (Jaskolski et coll., 2009)	20
Figure 12 : Représentation de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Jaskolski et coll., 2009).....	21
Figure 13 : Mécanisme de synthèse des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Chechley et coll., 2011).....	22
Figure 14 : Représentation structurale des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Chechley et coll., 2011)	24
Figure 15 : Domaines fonctionnels de la protéine Tat (Liang et Wainberg, 2002).....	25
Figure 16 : Domaines d'organisation de la protéine Rev (Dimattia et coll., 2010)	27
Figure 17 : Mécanisme de la dégradation de l'APOBEC3G induite par la protéine Vif (Goila-Gaur et Strelbel, 2008)	28
Figure 18 : Interaction Vif-APOBEC3G dans la réPLICATION du VIH-1 chez les cellules non permissives (Argyris et Pomerantz, 2004)	29
Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr du VIH-1 (Morellet et coll., 2003)	30
Figure 20 : Les différentes fonctions de la protéine Vpr dans la réPLICATION virale (Le Rouzic et Benichou, 2005)	31
Figure 21 : Représentation de la structure de la protéine Vpu (Fischer, 2003).....	32
Figure 22 : Cycle de réPLICATION du VIH-1 (Turner et Summers, 1999)	35

Figure 23 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible (Doms et Peiper, 1997)	36
Figure 24 : Les différentes étapes de la rétrotranscription (Basu et coll., 2008).....	39
Figure 25 : Processus de recombinaison (Simon-Lorière et coll., 2006).	47
Figure 26 : Distribution géographique des sous-types et CRFs du VIH-1, groupe M (Santos et Soares, 2010).....	51
Figure 27 : Mécanisme de sélection de virus résistants sous traitement ARV (Delaugerre et coll., 2007).....	70
Figure 28 : La probabilité cumulée chez les 366 patients en termes de : 1) succès virologique initial, 2) échec virologique, 3) résistance et 4) changement de traitement	93
Figure 29 : Modélisation de la dynamique du taux de lymphocytes T CD4 après la mise sous traitement ARV	94
Figure 30 : Relation entre la probabilité cumulée d'échec virologique, de résistance et d'observance (par catégorie de traitement ARV).....	95
Figure 31 : Fréquences des principales résistances aux différents ARV chez les patients en échec virologique	96
Figure 32 : La variabilité et relation phylogénétique au sein de la population d'étude	109
Figure 33 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce A.....	130
Figure 34 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce D.....	131
Figure 35 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce H.....	132
Figure 36 : Phylogénie et analyse de recombinaison des prélèvements.....	142
Figure 37 : Présentation des chromatogrammes dans le cas d'une population pure ou mixte	144
Figure 38 : Phylogénie moléculaire des différents isolats obtenus par SGA	146
Figure 39 : Evolution des paramètres immuno-virologiques chez la patiente X	148
Figure 40 : Résultat de similarité des virus recombinants portés par la patiente X et le conjoint Y	149
Figure 41 : Lien épidémiologique entre les isolats de la patiente X et ceux de son conjoint Y	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes classes et molécules antirétrovirales (Tang et Shafer, 2012)	62
Tableau II : Les différentes mutations de résistance aux INTIs (http://hivdb.stanford.edu/ , Novembre 2011).....	72
Tableau III : Les différentes mutations de résistance aux INNTIs (http://hivdb.stanford.edu/ , Novembre 2011).....	74
Tableau IV : Les différentes mutations de résistance aux IPs (http://hivdb.stanford.edu/ , Novembre 2011).....	75
Tableau V : Les différentes mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase (http://hivdb.stanford.edu/ , Novembre 2011).....	76
Tableau VI : Les différentes mutations de résistance à l'enfuvirtide (http://hivdb.stanford.edu/ , Novembre 2011).....	77
Tableau VII : Caractéristiques de la population d'étude à l'inclusion (N=366)	92
Tableau VIII : Les caractéristiques de la population d'étude.....	107
Tableau IX : Les mutations de résistance au niveau de la TI associées à une résistance aux INTIs	111
Tableau X : Les mutations de résistance au niveau de la TI associées à une résistance aux INNTIs	113
Tableau XI : Les mutations de résistance au niveau de la protéase associées à une résistance aux IPs	115
Tableau XII : Performance des amorces du ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 sur les différents sous-types, CRFs and URFs	128
Tableau XIII : Liste des prélèvements séquentiels de la patiente X	143
Tableau XIV : Les différents isolats et types de souches après SGA et séquençage	145
Tableau XV : Génotypage de résistance des différents isolats obtenus après SGA.....	147

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH-1	4
I. Aspects épidémiologiques	4
I.1. Définition, classification des VIH	4
I.2. Origines des VIH	5
I.3. Le VIH dans le monde	8
II. Aspects virologiques	10
II.1. Morphologie et structure	10
II.2. Organisation génomique.....	11
II.2.1. Les LTR (Long Terminal Repeat).....	12
II.2.2. Les gènes de structure.....	14
II.2.2.1. Le gène <i>gag</i> (gène des antigènes de groupe)	14
II.2.2.2. Le gène <i>pol</i> (Polymerase).....	16
II.2.2.3. Le gène <i>env</i> (envelope)	21
II.2.3. Les gènes régulateurs	25
II.2.3.1. Le gène <i>tat</i> (trans-activator of transcription)	25
II.2.3.2. Le gène <i>rev</i> (regulator of expression virus).....	26
II.2.4. Les gènes accessoires	28
II.2.4.1. Le gène <i>vif</i> (virion infectivity factor)	28
II.2.4.2. Le gène <i>vpr</i> (viral protein R).....	30
II.2.4.3. Le gène <i>vpu</i> (viral protein U).....	32
II.2.4.4. Le gène <i>nef</i> (negative expression factor)	33
II.3. Cycle de réPLICATION du VIH-1	34
II.3.1. La phase précoce	35
II.3.1.1. Fusion et entrée de l'ARN viral	35
II.3.1.2. Décapsidation et transcription inverse.....	37
II.3.1.3. Intégration de l'ADN viral	39
II.3.2. La phase tardive.....	41
II.3.2.1. Transcription de l'ADN viral en ANRm	41
II.3.2.2. Assemblage des particules virales	41
II.3.2.3. Bourgeonnement et maturation de particules virales.....	43
III. La diversité génétique	44
III.1. Origine de la diversité génétique.....	44

III.1.1. Les mutations aléatoires.....	45
III.1.2. La recombinaison génétique	45
III.2. Epidémiologie moléculaire du VIH dans le monde.....	48
III.2.1. Les différents groupes et sous-types du VIH	48
III.2.2. Les formes recombinantes circulantes	48
III.2.3. La répartition du VIH-1 dans le monde.....	49
III.3. Conséquences de la diversité génétique	54
III.3.1. Impact sur le diagnostic et le monitoring	54
III.3.2. Impact sur la transmission et la progression de la maladie.....	55
III.3.3. Impact sur la prise en charge thérapeutique.....	55
III.3.4. Impact sur la recherche vaccinale	56
III.4. Méthode de détermination des groupes et sous-types du VIH-1.....	57
III.4.1. Détermination du génotype par sérotypage	57
III.4.2. Détermination du génotype par des techniques moléculaires	58
III.4.2.1. Séquençage et phylogénie moléculaire	58
III.4.2.2. Multi-region Hybridization Assay (MHA)	59
III.4.2.3. Single Genom Amplification (SGA).....	59
IV. Le traitement antirétroviral et la résistance du VIH-1 aux ARV.....	60
IV.1. Les molécules antirétrovirales.....	61
IV.1.1 Les différentes classes et molécules actuelles	61
IV.1.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (TI)	62
IV.1.1.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI (INTIs)	63
IV.1.1.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTIs)	63
IV.1.1.2. Les inhibiteurs de la protéase.....	64
IV.1.1.3. Les inhibiteurs d'intégrase.....	65
IV.1.1.4. Les inhibiteurs d'entrée et de fusion.....	66
IV.1.2 Les molécules antirétrovirales en développement	66
IV.2. La résistance aux ARV	68
IV.2.1. Définition de la notion de résistance	69
IV.2.2. Les mutations associées à une résistance aux ARV	70
IV.2.2.1. Les mutations de résistance aux INTIs.....	71
IV.2.2.2. Les mutations de résistance aux INNTIs	73
IV.2.2.3. Les mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase	74
IV.2.2.4. Les mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase	76
IV.2.2.5. Les mutations de résistance aux inhibiteurs de fusion.....	76

IV.3. Méthodes d'étude de la résistance aux ARV	77
IV.3.1. Les tests génotypiques	77
IV.3.1.1. Le séquençage nucléotidique	78
IV.3.1.2. la détection des variants minoritaires	80
IV.3.2. Les tests phénotypiques	82
DEUXIEME PARTIE : ANALYSE DES TRAVAUX	85
I. Contexte et justificatif de l'étude.....	85
I.1. Contexte	85
I.2. Justificatif.....	86
II. Publications scientifiques	89
II.1. Evaluation de la réponse virologique et de la survenue de résistance du VIH-1 aux ARV après 10 ans de traitement ARV au Sénégal, cohorte ANRS 1215	89
II.1.1. Problématique	89
II.1.2. Objectif	89
II.1.3. Méthodologie	89
II.1.4. Résultats	91
II.1.5. Conclusion	97
II.2. Détermination de la prévalence des mutations de résistance aux ARV et la variabilité génétique du VIH-1 chez une population sous ARV et suivie selon l'approche santé publique au Sénégal	105
II.2.1. Problématique	105
II.2.2. Objectif	105
II.2.3. Méthodologie	105
II.2.4. Résultats	106
II.2.5. Conclusion	116
II.3. Evaluation des performances d'une technique génotypique : le ViroSeq, face à la variabilité génétique des souches de VIH-1 qui circulent au Sénégal.....	125
II.3.1. Problématique	125
II.3.2. Objectif	125
II.3.3. Méthodologie	125
II.3.4. Résultats	127
II.3.5. Conclusion	133
II.4. Documentation d'un cas de surinfection chez une patiente VIH-1 groupe M sous ARV au Sénégal (cohorte ANRS 1215).....	141

II.4.1. Introduction : découverte de la surinfection.....	141
II.4.2. Méthodologie	142
II.4.3. Résultats	144
II.4.4. Discussion	151
II.4.5. Conclusion	152
II.4.6. Communication	152
<i>DISCUSSION</i>	153
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	160
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	164
<i>ANNEXE : AUTRE PUBLICATION</i>	200
<i>RESUME</i>	208

INTRODUCTION

Rapport!

vatuit.com

INTRODUCTION

Le Syndrome d’Immunodéficience Acquise (SIDA) est la maladie causée par deux virus de la famille des *Retroviridae* et du genre des *lentivirus*, qui sont le VIH-1 et le VIH-2 (**Barré-Sinoussi et coll., 1983 ; Clavel et coll. 1986**). Le VIH-1 est responsable de la pandémie actuelle, tandis que le VIH-2 reste essentiellement localisé en Afrique de l’Ouest. Les VIH-1 et VIH-2 sont apparentés aux *lentivirus* des primates, que l’on a appelé SIV pour simian immunodeficiency virus. Les données de la littérature ont montré qu’au moins 40 espèces de primates non humains sont infectées par des SIV. Trois de ces espèces sont impliquées dans le franchissement de la barrière d’espèce, qui a donné les VIH (Virus de l’Immunodéficience Humaine) chez les humains. En Afrique de l’Ouest, les mangabeys enfumés ont transmis leur SIV à l’Homme à huit reprises, ce qui a conduit aux 8 groupes (A-H) connus pour le VIH-2 (**Peeters et coll., 2008 ; Etienne et Peeters, 2010**). Cependant, une nouvelle lignée de transmission, qui aboutirait au 9^{ème} groupe de VIH-2, est décrite en Côte d’Ivoire et phylogénétiquement liée avec les SIVsmm (**Ayoub et coll., 2012**). Dans la partie australe et équatoriale de l’Afrique, ce sont les grands singes, chimpanzés et gorilles, qui sont à l’origine du VIH-1 (**Etienne et Peeters, 2010**). Quatre transmissions inter-espèces indépendantes ont donné naissance aux 4 groupes du VIH-1 (M, N, O et P) (**Van Heuverswyn et coll., 2006 ; Plantier et coll., 2009**). Le groupe M (pour Major) représente 98% des infections dans le monde avec une très grande diversité de souches et son épicentre a été localisé plus particulièrement au Congo Kinshasa (**Vidal et coll., 2000 ; Djoko et coll., 2011**). Les groupes O (Outlier ou divergent), le groupe N (non-M, non-O) sont retrouvés principalement en Afrique du Centre-Ouest (**Van Heuverswyn et coll., 2006**). Enfin, le groupe P, proche des SIVgor est récemment décrit. Ils représentent très peu de cas d’infections et leur épicentre se situe essentiellement au Cameroun (**Plantier et coll., 2009 ; Vallari et coll., 2010**). Au sein du groupe M, le VIH-1 de sous-type B prédomine dans les pays du Nord et il est responsable de l’épidémie initiale dans les pays industrialisés, en particulier l’Amérique du Nord et l’Europe de l’Ouest. Par contre, à l’échelle mondiale, les VIH-1 non-B représentent au moins 90% des virus circulants (**Geretti, 2006**). La forme la plus répandue des VIH-1 est le sous-type C, qui affecte les zones de l’Afrique Australe et de l’Est, l’Inde, et circule aussi en Chine et en Amérique du Sud (**Hemelaar et coll., 2011**). Selon le rapport de l’ONUSIDA de fin 2012, le nombre total de personnes vivant avec le virus de l’immunodéficience humaine en 2011 est estimé à 34,0 millions [31,4 millions–35,9 millions]. La prévalence des personnes nouvellement infectées par le VIH est de 2,5 millions [2,2 millions–2,8 millions] en 2011. En

Afrique Sub-saharienne, le nombre total de personnes (adultes et enfants) vivant avec le VIH est estimé à 23,5 millions [22,1 millions–24,8 millions] (**UNAIDS, 2012**).

La diversité génétique du VIH-1 aux Sénégal est caractérisée par la prédominance d'un virus recombinant entre les sous-types A et G : le CRF02_AG, dans la population générale (**Touré-kane et coll., 2000 ; Diop-Ndiaye et coll., 2010**) et chez les professionnelles du sexe (**Hamel et coll., 2007**). Cependant une forte prévalence du sous-type C a été démontrée chez les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH), ou MSM en anglais (Men who have Sex with Men) (**Dop-Ndiaye et coll., 2009**). Au Sénégal, l'épidémie est de type concentré, avec une prévalence faible et stable (0,7% en 2009) dans la population générale. Cependant, elle est beaucoup plus élevée dans les populations clés que sont les professionnelles du sexe et les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) (<http://www.orlysoft.com/sites/rars/images/stories/Bulletin14.pdf>).

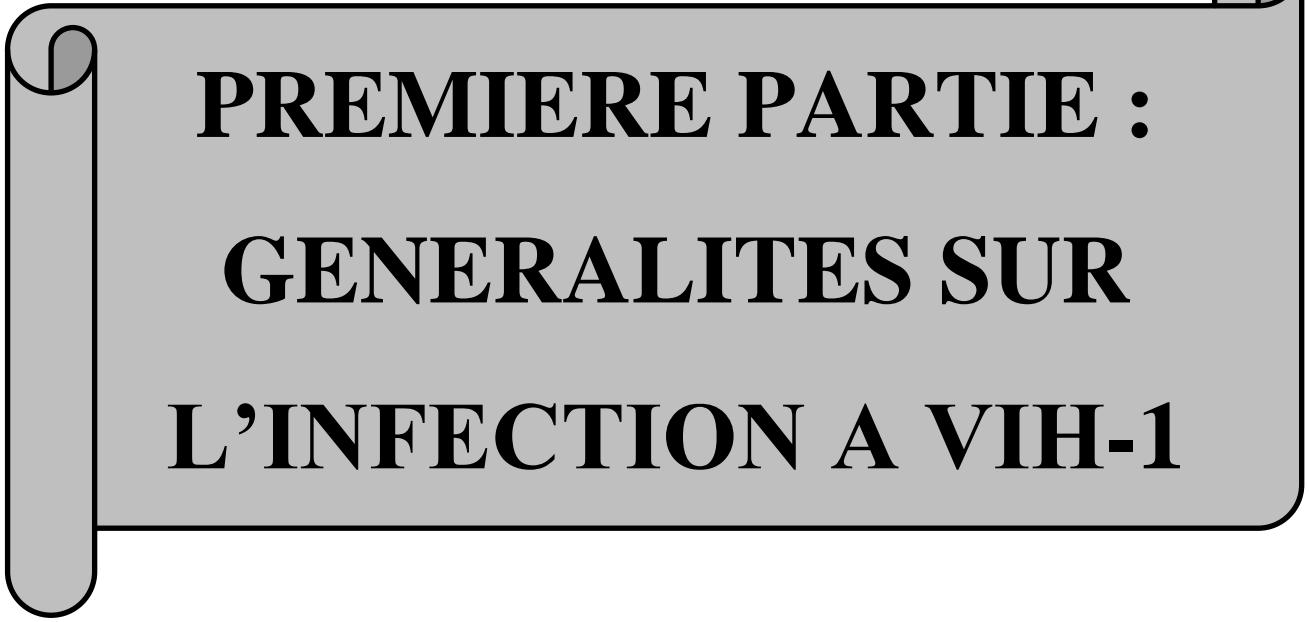
La grande diversité et la prévalence élevée du VIH dans le monde, ont fait l'objet du développement de plusieurs molécules antirétrovirales (ARV) approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) pour maîtriser l'infection à VIH (**Mehellou et De Clercq, 2010**). Selon le rapport de l'ONUSIDA, 14,8 millions de personnes sont éligibles au traitement ARV. Cependant, 8 millions seulement sont effectivement sous ARV (**UNAIDS, 2012**). L'objectif du traitement antirétroviral est de transformer l'infection virale en une infection chronique, par l'utilisation de molécules antirétrovirales efficaces avec différentes combinaisons thérapeutiques (**Tsibris et Hirsch, 2010**). Cependant, la gestion de l'infection à VIH est très complexe et constitue un problème majeur de santé publique, car il est indispensable de concilier l'efficacité des ARVs avec une évaluation de la toxicité et de l'adhérence au traitement pour éviter les échecs thérapeutiques liés à la sélection des mutations de résistance (**Tourmond et coll., 2010 ; Tsibris et Hirsch, 2010**). Dans un souci de standardisation et sur la base d'études de recherches biologiques et cliniques, des recommandations sont périodiquement formulées pour la sélection des différents schémas thérapeutiques contre l'infection à VIH-1. Selon les nouvelles recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans les pays à ressources limitées, tout patient ayant un taux de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³ doit être mis sous ARV, quel que soit le stade clinique de l'OMS. Ce traitement ARV doit comprendre deux INTIs et un INNTI pour la première ligne et deux INTIs plus un IP boosté pour la seconde ligne en cas d'échec de la ligne précédente. L'échec dans la gestion de l'infection à VIH peut être clinique (apparition d'infections opportunistes ou stade 4 de l'OMS après 6 mois de traitement ARV),

immunologique (un taux de CD4 qui reste inférieur à 100 cellules/mm³ ou une réduction de 50% par rapport à la valeur initiale), virologique (charge virale supérieure à 1000 copies/ml à deux mesures consécutives après 3 mois de traitement ARV chez un patient observant) et thérapeutique occasionnant un changement de ligne (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf). Le suivi du traitement antirétroviral se fait par une quantification de la charge virale plasmatique et une numération du taux de CD4 tous les six mois plus des visites cliniques (**Laurent et coll., 2002**). L'efficacité du traitement antirétrovirale est mesurée en termes de tolérance, de toxicité à long terme mais surtout par l'absence d'apparition de virus résistants (**Delaugerre et coll., 2007**). A coté de ces facteurs liés aux molécules antirétrovirales, la diversité génétique du virus peut aussi induire des difficultés dans la prise en charge des personnes vivant avec le VIH (**Vella et coll., 2012**). Les techniques d'étude de la résistance aux ARV ont été développées dans les pays occidentaux à partir des souches de VIH-1 de sous-type B, qui ne circulent que très rarement dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique sub-saharienne (**Chen et coll., 2007**). Les molécules antirétrovirales ont amélioré la qualité de vie et la santé des personnes vivant avec le VIH. Cependant, les bénéfices cliniques peuvent être compromis par l'émergence de virus résistants, due à la sélection de mutations, sous pression médicamenteuse, au niveau des gènes cibles des différentes molécules antirétrovirales, plus particulièrement, la transcriptase inverse et la protéase (**Tournoud et coll., 2010**).

C'est dans ce contexte que nous nous proposons d'étudier la résistance secondaire du VIH-1 aux ARV chez les patients de l'Initiative Sénégalaise d'accès aux Antirétroviraux (ISAARV) sur les plans épidémiologique et technique.

Pour répondre à ces préoccupations, le présent document s'articulera selon le plan suivant :

- Une première partie de rappels sur la biologie du VIH, la diversité génétique, le traitement ARV, la résistance aux ARV et ses différentes techniques d'études,
- Une deuxième partie relatant les différents travaux et publications scientifiques,
- Une discussion des résultats obtenus, une conclusion générale et des perspectives.



PREMIERE PARTIE :

GENERALITES SUR

L'INFECTION A VIH-1

PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH-1

I. Aspects épidémiologiques

I.1. Définition, classification des VIH

Le VIH est un *lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Les *Retroviridae* (ou Rétrovirus) constituent une vaste famille de virus à ARN caractérisée par la présence d'une enzyme structurale, la transcriptase inverse (TI) et par leur mode de réPLICATION. La transcriptase inverse est capable de synthétiser, à partir de l'ARN viral, un ADN double brin qui va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Il se réplique alors en même temps que le génome de la cellule hôte (**Coffin et coll., 1997**).

Selon la dernière classification taxonomique, (**Coffin et coll., 2003**), la famille des Rétrovirus est subdivisée en sept genres :

- Les *Alpharetrovirus* (Rétrovirus type C aviaires)
- Les *Betaretrovirus* (Rétrovirus type B des mammifères)
- Les *Gammaretrovirus* (Rétrovirus type C des mammifères)
- Les *Deltaretrovirus* (BLV-HTLV)
- Les *Epsilonretrovirus* (Rétrovirus type D)
- Les *Lentivirus* (VIH, SIV ...)
- Les *Spumavirus*.

Les Rétrovirus sont capables d'infecter toutes les espèces animales, notamment des vertébrés parmi lesquels les bovins, les équidés, les chats, les caprins et les primates (**Gifford et coll., 2008**). Le VIH est classé dans le genre des *lentivirus* des primates à l'instar des virus de l'immunodéficience simienne ou SIV (*Simian Immunodeficiency virus*). Les *lentivirus* sont des virus provoquant des pathologies à évolution lente c'est-à-dire avec une longue période de latence. Les primates africains sont porteurs asymptomatiques et naturels de SIV et bien qu'ils soient nommés virus de l'immunodéficience simienne, ces derniers n'entraînent pas de maladie chez leur hôte naturel suggérant une adaptation depuis une longue période. Cependant le transfert d'une espèce donnée à une autre peut, chez certaines espèces engendrer l'immunodéficience comme dans le cas de l'infection du macaque rhésus par le SIVsmm du Sooty mangabey (**Silvestri et coll., 2005**).

I.2. Origines des VIH

Les premiers cas d'infections liées au VIH ont été décrits aux USA avec une augmentation de la fréquence des infections à *Pneumocysti carinii pneumoniae* et des sarcomes de Kaposi dans la communauté des hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) (CDC, 1981). Très vite, il a été suggéré que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) était dû à un agent infectieux transmis par les voies sanguines et sexuelles. Le SIDA est la maladie causée par deux virus de la famille des *Retroviridae* et du genre *lentivirus* que sont : le VIH-1 et le VIH-2. En 1983, l'équipe de Barré-Sinoussi isole le VIH-1, baptisé dans un premier temps LAV (pour *Lymphadenopathy Associated Virus*) (**Barré-Sinoussi et coll., 1983**). En 1986, un deuxième virus a été identifié par l'équipe de Montagnier, chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest et il fut appelé VIH- 2 (**Clavel et coll. 1986**). Le VIH-1 est responsable de l'épidémie dans le monde entier. Cependant, le VIH-2 reste confiné en Afrique de l'ouest. Les virus VIH-1 sont jusque-là classés en quatre groupes M, N, O et P (**Van Heuverswyn et coll., 2006 ; Plantier et coll., 2009**). Le groupe M, qui représente 98% des infections dans le monde, une grande diversité et son épicentre serait localisé en Afrique Central (**Vidal et coll., 2000**), le groupe O (Outlier ou divergent), le groupe N (non-M, non-O) retrouvé principalement en Afrique du Centre-Ouest (**Van Heuverswyn et coll., 2006**). La mise en évidence du groupe P, qui serait proche des SIVgor a été décrite (**Plantier et coll., 2009 ; Vallari et coll., 2010**).

La comparaison des positions phylogénétiques d'isolats représentatifs de l'ensemble des souches de VIH avec celles d'isolats de virus simiens a mis en évidence l'existence de liens génétiques entre les *lentivirus* des primates et les VIHs. Bien qu'il existe près de 40 espèces de primates non humains qui semblent être infectés par un SIV, seules trois sont reconnues comme étant impliquées dans le franchissement de la barrière d'espèce. Il s'agit des chimpanzés et des gorilles d'Afrique Centrale ou de l'Ouest avec la lignée SIVcpz/SIVgor qui sont à ce jour connus pour héberger des SIV définitivement proches des VIH-1 et les mangabeys enfumés en Afrique de l'Ouest avec la lignée SIVsmm proche des VIH-2 (**Peeters et coll., 2008 ; Etienne et Peeters, 2010**).

Les analyses phylogénétiques représentées dans la figure 1 ont montré que l'ensemble des chimpanzés collectionnés au Cameroun plus particulièrement l'espèce *Pan troglodytes troglodytes*, forme un même cluster avec les VIH-1 groupe M et N. Cependant les VIH-1, groupe O sont associés à d'autres types à savoir les gorilles avec l'espèce *Gorilla gorilla*. (**Van Heuverswyn et coll., 2006 ; Keele et coll., 2006**).

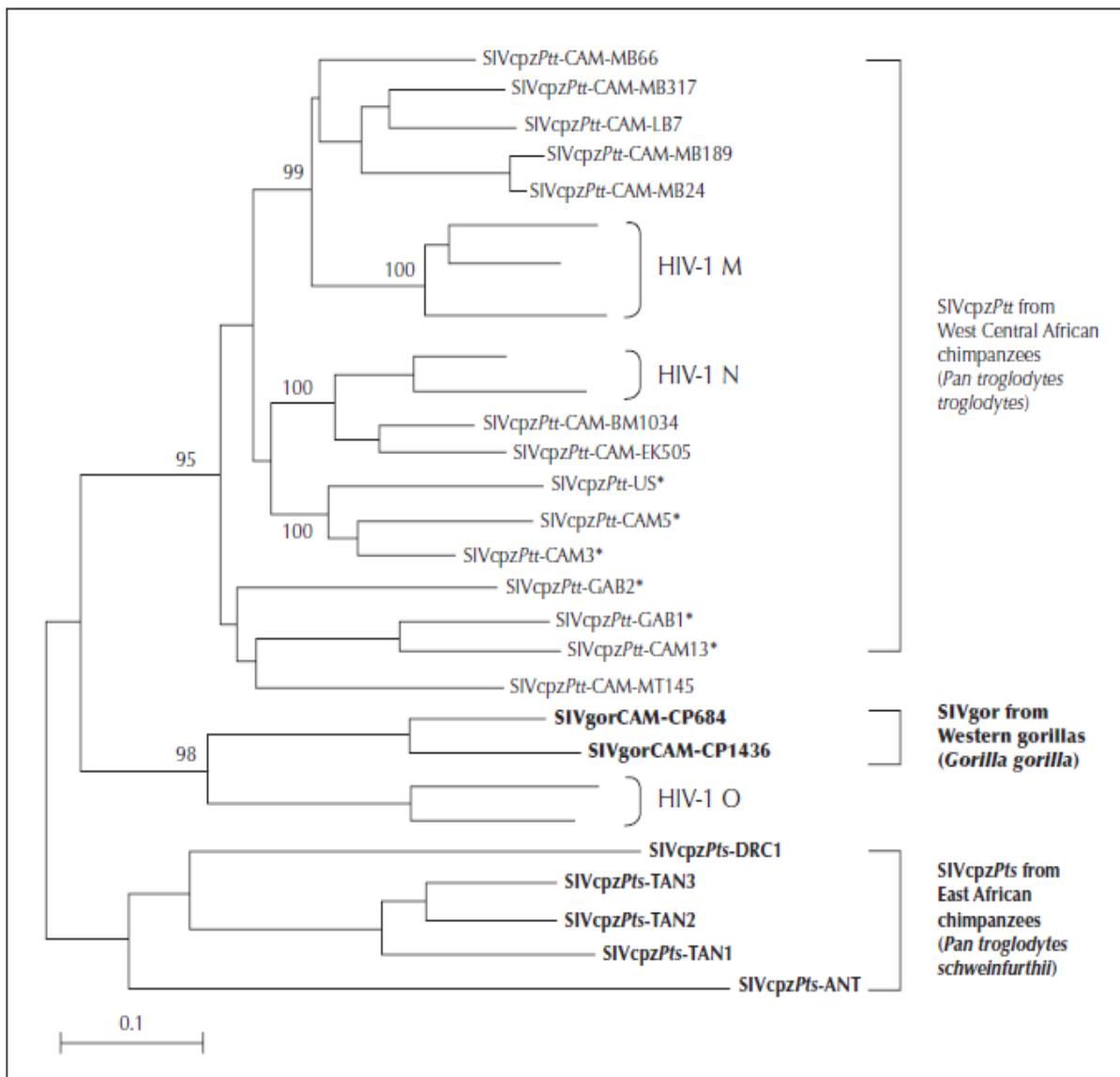


Figure 1 : Relation phylogénétique entre les SIVscpz, SIVgor et VIH-1 (Van Heuverswyn et coll., 2007).

Les analyses phylogénétiques laissent suggérer que les gorilles auraient été infectés à partir des chimpanzés. Ceci laisse supposer que les VIH-1 proviendraient d'une seule et unique lignée de SIVcpz/SIVgor mais par l'intermédiaire d'au moins quatre transmissions indépendantes des virus de cette lignée, donnant ainsi les 4 groupes M, N, O et P (Neel et coll., 2009). En effet, les relations phylogénétiques entre SIVcpz, SIVgor et VIH-1 indiquent que les chimpanzés représentent le réservoir original des SIVs qui sont aujourd'hui présents chez les chimpanzés, les gorilles et chez l'homme. Cependant de nombreuses questions restent encore non élucidées, en particulier la manière dont les gorilles ont été contaminés.

Des études d'horloges moléculaires estiment la date de l'ancêtre commun de tous les VIH-1 groupe M et groupe P respectivement en 1930 et 1920 (**Peeters et coll., 2008**).

La figure 2 illustre la proximité phylogénétique entre les souches de SIVcpz et les VIH-1 des groupes M et N d'une part et d'autre part, entre les souches de SIVgor et les VIH-1 des groupes O et P (Plantier et coll, 2009).

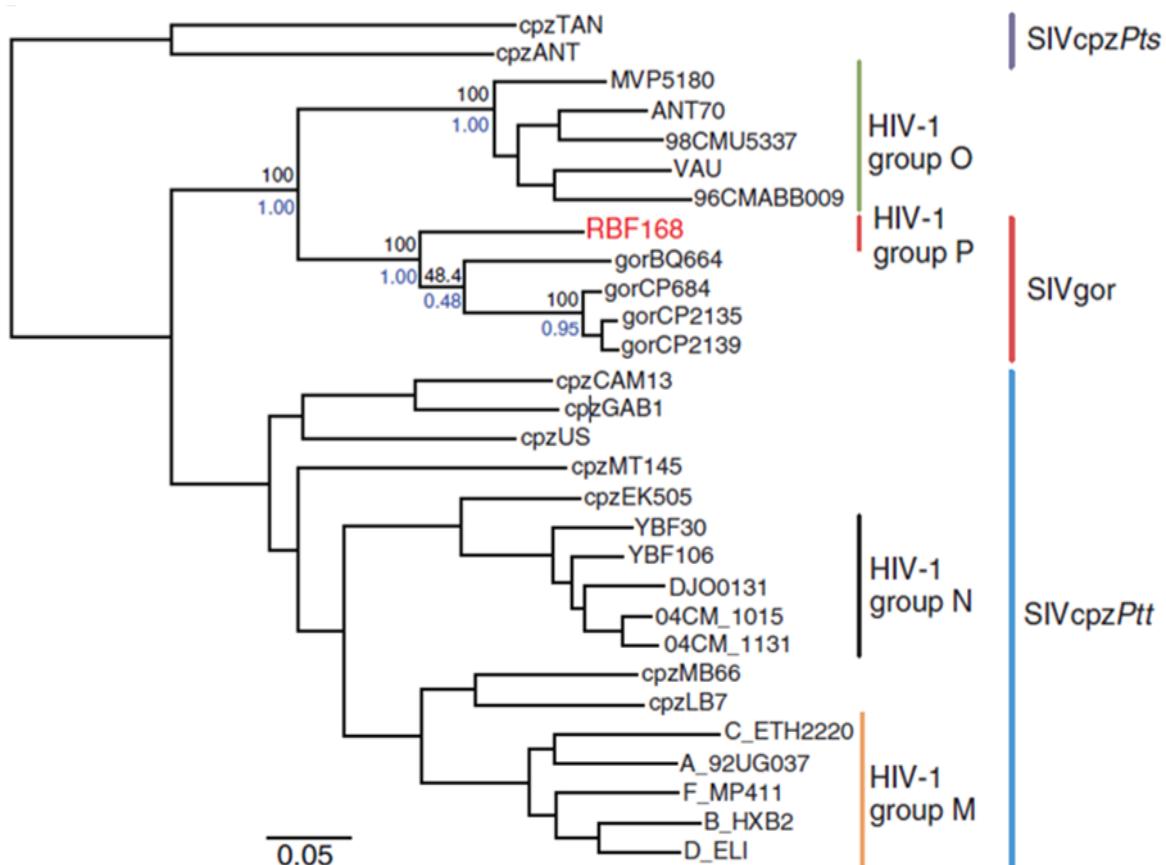


Figure 2 : Arbre phylogénétique des VIH-1 et des SIVcpz et SIVgor (Plantier et coll., 2009)

Une relation phylogénétique étroite, figure 3, a été également observée entre les SIVmm du mangabey enfumé, *Cercocebus atys* et le VIH-2 d'Afrique de l'Ouest. Les pays comme le Sénégal et la Côte d'Ivoire constituent l'épicentre de ces mangabeys et coïncident avec l'apparition du VIH-2. Huit groupes de VIH-2 (A à H) ont été décrits à ce jour, mais seul les groupes A et B sont responsables de l'épidémie à VIH-2 et circulent principalement en Guinée Bissau et au Sénégal pour le groupe A et en Côte d'Ivoire pour le groupe B (**Damond et coll., 2004**). Les autres groupes n'infectent que peu d'individus et sont représentés dans des pays comme le Libéria et la Sierra Léone (**Santiago et coll., 2005**). Les études d'horloge moléculaire font remonter l'émergence du VIH-2 aux années 1940 pour le groupe A et en

1945 pour le groupe B (Lemey et coll., 2003). Une nouvelle transmission chez les VIH-2 a été décrite en Côte d'Ivoire et présente des liens phylogénétiques avec les SIVsomm (Ayoub et coll., 2012)

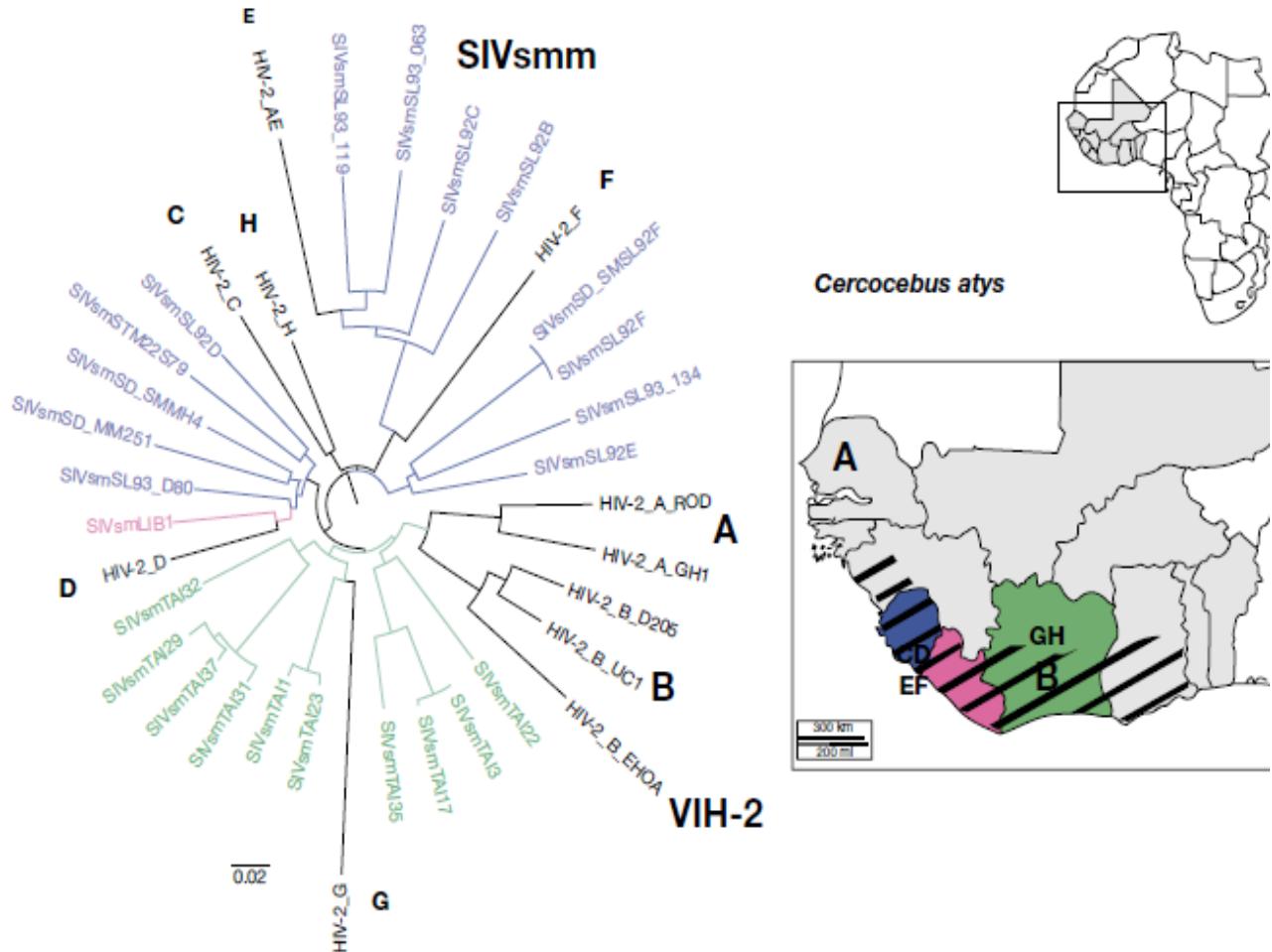


Figure 3 : Arbre phylogénétique des différents groupes de VIH-2 (gauche) et leur distribution géographique (droite) (Etienne et Peeters, 2010).

I.3. Le VIH dans le monde

Selon le rapport de l'ONUSIDA de 2012, le nombre total de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine en 2011 est estimé à 34,0 millions [31,4 millions–35,9 millions]. Le nombre des personnes nouvellement infectées par le VIH est de 2,5 millions [2,2 millions–2,8 millions] en 2011. En Afrique Sub-saharienne, le nombre total de personnes (adultes et enfants) vivant avec le VIH est estimé à 23,5 millions [22,1 millions–24,8 millions] et les nouvellement infectées (adultes et enfants), à 1,8 millions [1,6 millions–2,0 millions]. En 2011, 69% des personnes infectées et 70% des personnes nouvellement

infectées par le VIH vivent en Afrique sub-saharienne. Le nombre total de décès liés au SIDA dans le monde entier, est estimé à 1,7 millions [1,5 millions – 1,9 millions] en 2011 donc, un déclin de 24%, comparé aux données de 2005 pour 2,3 millions de décès [2,1 millions–2,6 millions]. En Afrique Sub-saharienne, ce nombre de décès a diminué de 32% entre 2005 et 2011. Cependant, 70% des décès en 2011, ont été enregistrés dans cette région (**UNAIDS, 2012**).

Au Sénégal, l'épidémie du VIH est de type concentré avec une prévalence faible (0,7% en 2009) dans la population générale mais beaucoup plus élevée dans les populations clés à savoir les professionnelles du sexe (18,5%), les MSM (21,8%) et les injecteurs de drogues intraveineuses (9,2%) (<http://www.orlysoft.com/sites/rars/images/stories/Bulletin14.pdf>). En 2011, l'ONUSIDA estime à 53 000 cas, le nombre de personnes vivant avec le VIH au Sénégal dont 70% étant des adultes de 15 à 49 ans (<http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/senegal/>). L'existence d'une communauté de MSM a été révélée depuis 2002 et plus de 20% des nouvelles infections à VIH au Sénégal survenaient dans la population des MSM (**Wade et coll., 2005**). Les résultats des enquêtes séro-épidémiologiques ont également montré la grande vulnérabilité de ce groupe aux IST en général et au VIH en particulier, avec des prévalences de 22,4% en 2004 et 21,8% en 2007 (**Wade et coll., 2010**). La prévalence du VIH au Sénégal varie suivant les localités, les sexes et l'état matrimonial. La prévalence du VIH-1 est plus élevée à Kolda (2,4%), à Tambacounda (1,2%) et à Ziguinchor (0,9%). La prévalence est de 0,8% chez les femmes et de 0,5% chez les hommes. Les femmes en rupture d'union ont une prévalence supérieure (4,6%) à celle des femmes en union (0,8%) (**Gaye et coll., 2012**).

II. Aspects virologiques

II.1. Morphologie et structure

Au microscope électronique, le virion mature se présente sous forme d'une particule sphérique enveloppée de 80-120 nm de diamètre (Figure 4) (**Coffin et coll., 1997**).

Comme tous les *lentivirus*, l'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Cette bicouche lipidique comporte entre autre deux types de glycoprotéines : la glycoprotéine externe (SU) gp120 exposée à la surface et la glycoprotéine transmembranaire (TM) gp41 (**Turner et Summers, 1999**). Cette enveloppe contient également des protéines de membrane d'origine cellulaire incluant les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, HLA classe I et classe II (**Arthur et coll., 1992**). La matrice, collée sous l'enveloppe, est composée d'environ 2000 copies de la protéine p17, MA. Dans la matrice se trouve aussi d'autres protéines accessoires que sont Nef, Vif, Vpr, Rev, Tat et Vpu. La matrice sépare ainsi physiquement l'enveloppe de la capsidé virale. Cette dernière, est localisée au centre de la particule virale et est formée d'environ 2000 copies de la protéine p24, CA. A l'intérieur de la capsidé se trouvent deux copies identiques d'ARN simple brin, linéaire, de polarité positive et d'environ 9,2 Kb et associées à des protéines pour former un complexe de nucléoprotéine. Parmi ces protéines, nous pouvons citer : 2000 copies de la protéine p7, NC et trois principales protéines enzymatiques à savoir la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase (**Arthur et coll., 1992 ; Turner et Summers, 1999**).

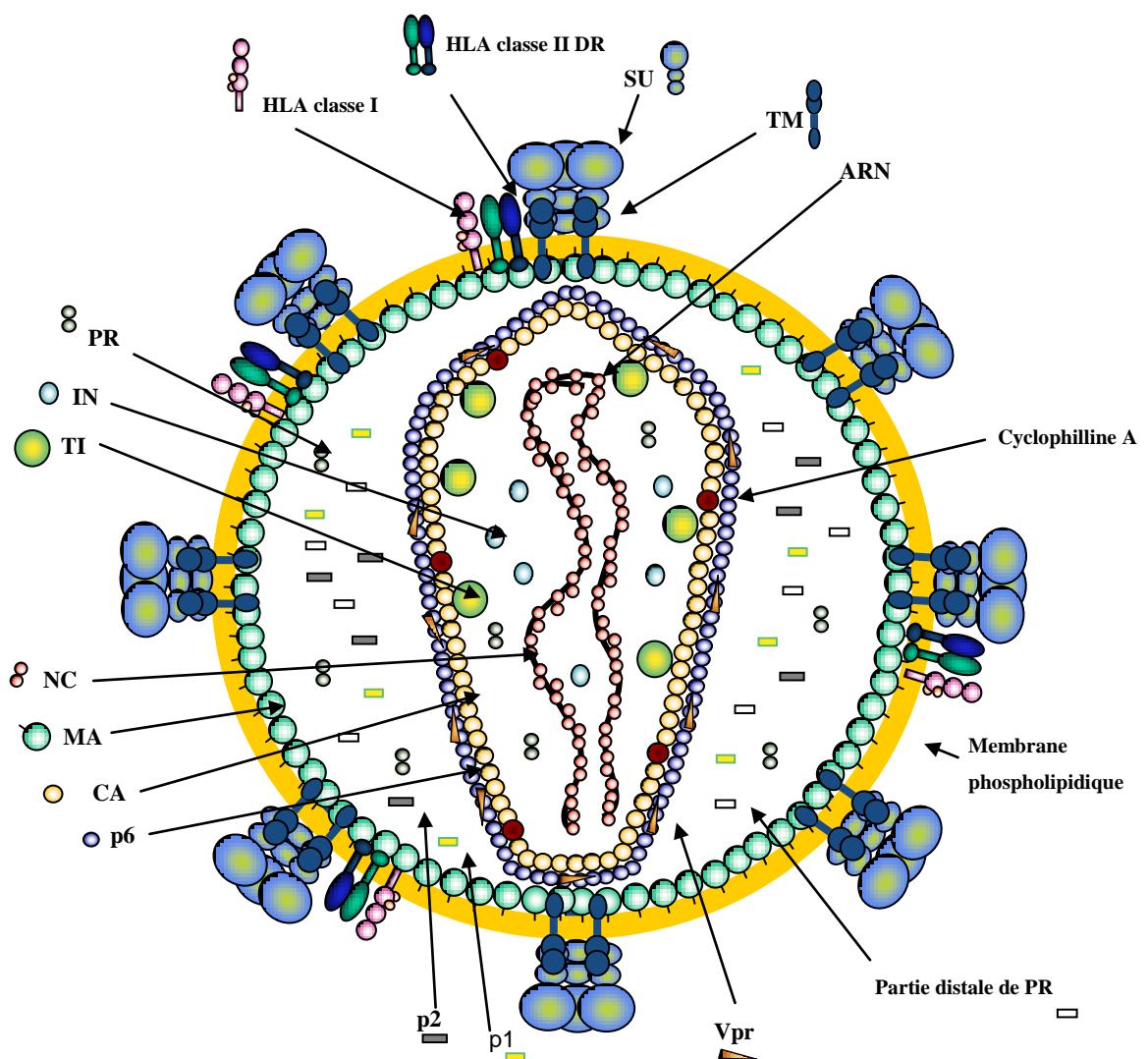


Figure 4 : La particule virale du VIH-1 (Coffin et coll., 1997)

II.2. Organisation génomique

Le génome du VIH-1 est d'une longueur de 9.2 kb et contenant des gènes qui sont au nombre de neufs. Ces gènes sont classés suivant trois groupes fonctionnels en gènes de structure : *gag*, *pol* et *env*, gènes régulateurs : *tat* et *rev* et gènes accessoires : *vpu*, *vpr*, *vif* et *nef*. L'ARN viral est flanqué de séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaisons à des protéines cellulaires : ce sont les LTR (*Long Terminal Repeat*) (Costin et coll., 2007).

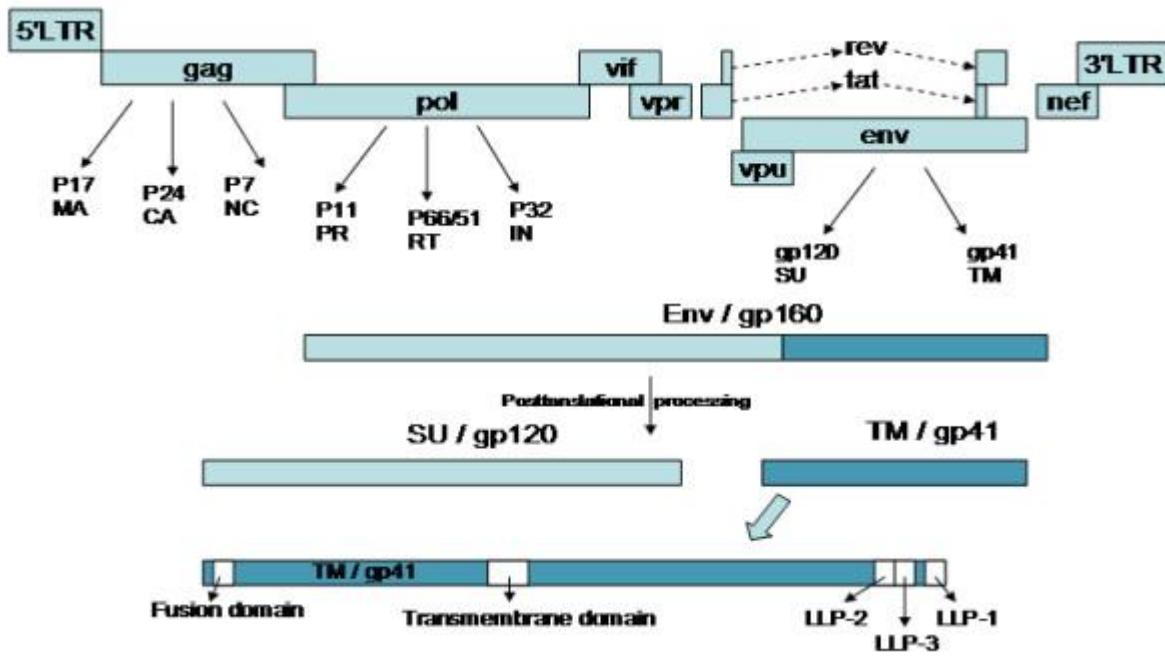


Figure 5 : Schéma du génome VIH-1 (Costin et coll., 2007)

II.2.1. Les LTR (Long Terminal Repeat)

Les LTRs sont composés de trois régions U3, R et U5 intervenant dans la transcription du génome viral et dans son intégration au sein du génome cellulaire (figure 6). Le LTR 5' est pour la plupart des rétrovirus, l'équivalent des régions promotrices des gènes cellulaires. La région U3 comprend des sites de liaisons pour des facteurs de transcription cellulaire dont le NFkB (généralement en 2 sites successifs) et le Sp1 (3 sites de fixation), mais aussi la boîte TATA qui est le signal de démarrage de la transcription de l'ARN messager. Cependant, le site de démarrage de l'ARNm se trouve à la jonction U3/R. Une interaction entre ces deux facteurs s'avère nécessaire pour l'expression des gènes du VIH-1. Les sites de fixation du facteur SP1 ont la propriété de réguler non seulement d'autres facteurs de transcription cellulaire, d'interagir avec la protéine Tat, mais aussi avec le NFkB pour induire la transcription (**Perkins et coll., 1993**).

Les régions R et U5 sont incluses dans le « leader RNA », figure 7, qui est constitué de différents éléments (TAR, polyA, PBS, DIS, SD, ψ) présentant une structure en épingle à cheveux. Ces éléments interviennent dans la régulation de l'expression des gènes (activation de la transcription, polyadénylation, translation...) et dans les fonctions associées au virion (dimérisation, encapsidation et transcription inverse) (**Berkhout, 1996**).

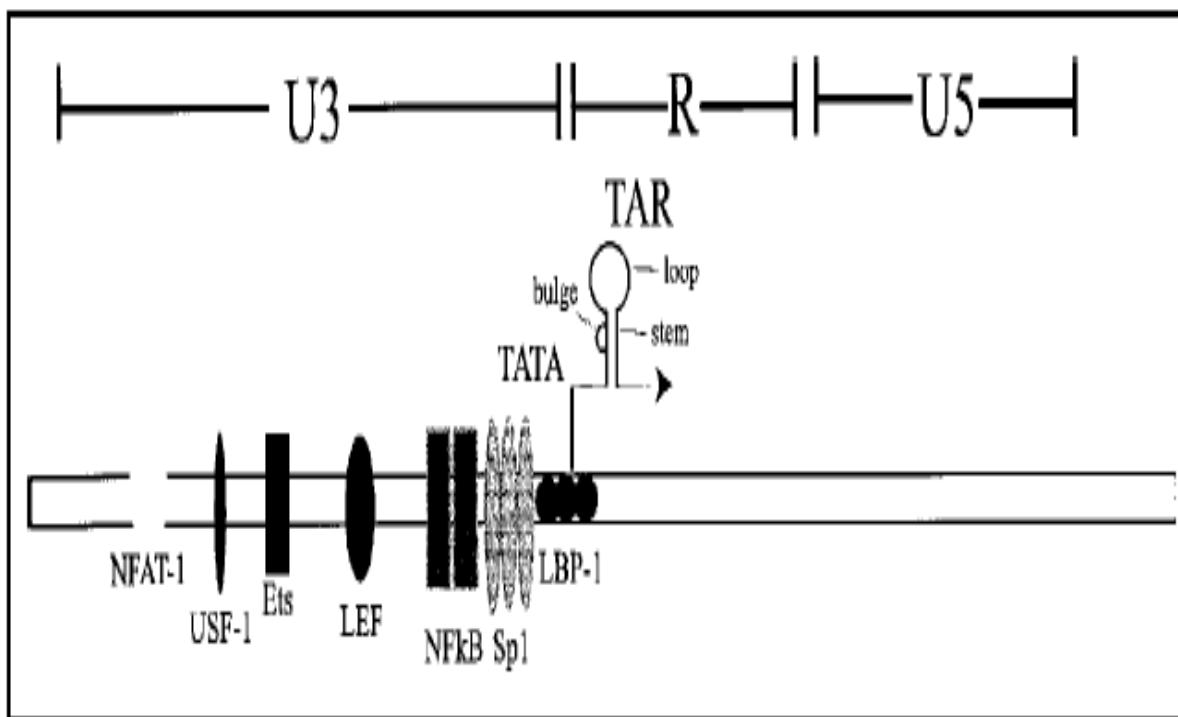


Figure 6 : Schéma du LTR 5' du provirus (Freed et coll., 2001)

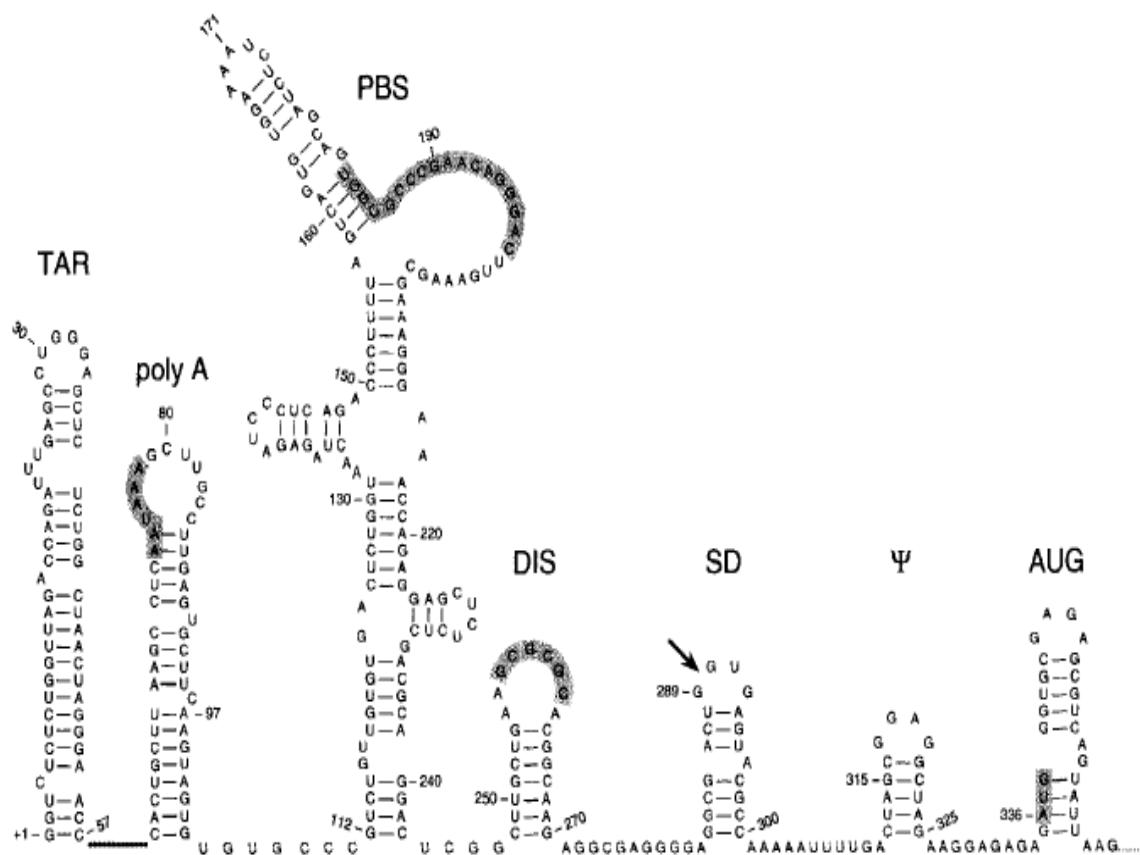


Figure 7 : Schéma du leader RNA du provirus (Berkhout, 1996).

L'élément TAR (trans-activation responsive region) et le poly (A) sont situés dans les premiers 97 acides aminés. L'élément TAR joue un rôle important dans la transactivation du LTR pendant la réPLICATION (**Wei et coll., 1998**). Il est également impliqué dans la régulation par la protéine Tat, de la transcription de l'ADN proviral en ARN messager et ARN génomique essentiel, dans l'activation de la transcription et dans le processus de réPLICATION puisque la déstabilisation de la structure affecte les capacités de réPLICATION (**Vrolijk et coll., 2008**). Le signal poly (A) intervient dans la polyadénylation des ARNm viraux (**Berkhout, 1996**).

Le PBS pour *Primer Binding Site*, situé en aval de la région R, est le site de liaison complémentaire à l'ARNt₃^{Lys} (**Berkhout et coll., 1997**). Ce site est primordial pour la transcription de l'ARN génomique en ADN proviral. En effet, c'est l'ARNt₃^{Lys} qui sert de première amorce à la transcriptase inverse lors du processus de rétro-transcription (**Leiman et coll., 2004**)

Le DIS ou signal de dimérisation joue un rôle essentiel dans la dimérisation durant la réPLICATION virale (**Girard et coll., 1999**). Le processus de dimérisation qui est une étape cruciale de la réPLICATION virale, n'est pas entièrement élucidé (**Andersen et coll., 2004**). Il a été démontré que la dimérisation survenait durant la transcription des ARNm épissés dans le noyau. Il joue ainsi un rôle dans l'épissage et le transport des ARN épissés qui devront former des hétérodimères avec l'ARN génomique (**Sinck et coll., 2007**).

Le signal d'encapsidation PSI (ψ), spécifique des ARNs génomiques viraux sur lequel s'accroche la nucléocapside, démarre à la fin du LTR 5' et recouvre les premiers acides aminés de Gag. Il comprend 4 domaines (SL1 à SL4) et chacun forme une structure en boucle, le domaine SL3 étant le plus conservé (**Clever et coll., 2002**). Le PSI joue un rôle supplémentaire dans la dimérisation et l'encapsidation durant la réPLICATION virale. Le leader RNA se termine par le codon d'initiation AUG à la position 336, qui correspond à un cadre de lecture (**Berkhout, 1996**).

II.2.2. Les gènes de structure

II.2.2.1. Le gène *gag* (gène des antigènes de groupe)

C'est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. Il fait environ 1500 pb et code pour la polyprotéine Pr55^{Gag} N-myristylée qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsidé (CA), la nucléocapsidé (NC) et la p6. Au cours de la maturation, le clivage

de la Pr55^{Gag} par la protéase virale (PR) donne les protéines structurales du virion mature p17MA, p24CA, p7NC, p6 et deux petits fragments p1 et p2, (figure 8) (Freed, 1998 ; Ono et coll., 2009). La protéine Gag est essentielle à l’assemblage, le bourgeonnement et la libération des particules virales de tous les rétrovirus à l’exception des spumavirus (Murakami, 2012).

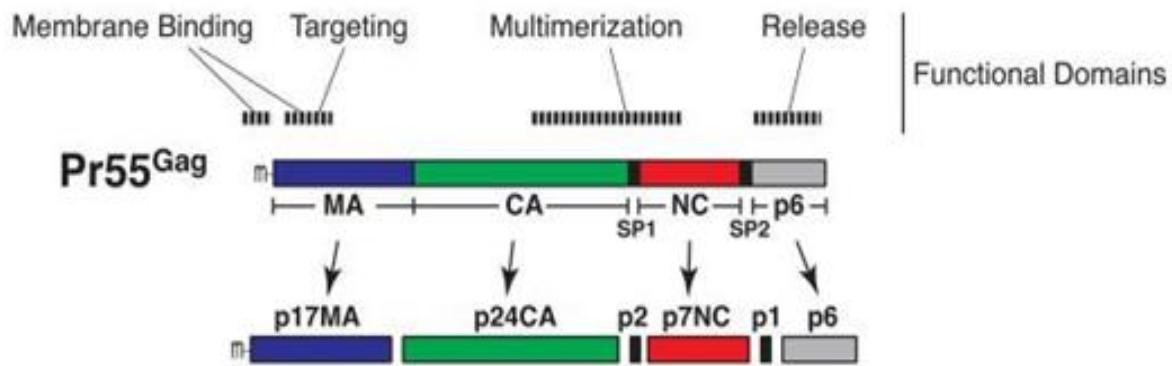


Figure 8 : Organisation du gène gag (Ono et coll., 2009)

La protéine p17 (MA), est multifonctionnelle avec plusieurs fonctions complexes qui sont responsables de la régulation des étapes tardives de la réplication virale (Manrique et coll., 2004). Elle joue un rôle crucial dans l’assemblage des protéines Gag et dans l’incorporation des glycoprotéines d’enveloppe, le gp41 (de Marco et coll., 2010). Des mutations comme V6R, L49D, et C86S au niveau des acides aminés de la MA entraîne une réduction de la virulence des virions (Marukami et coll., 2005). Il a été aussi démontré qu’un simple changement d’acide aminé au niveau de l’extrémité N-terminale de MA, entraîne une défaillance de l’assemblage des protéines lors de la réplication (Zhou et coll., 1994).

La protéine p24 (CA) est essentielle aux interactions durant l’assemblage des protéines Gag et constitue la partie externe qui enveloppe le génome viral et les protéines associées après clivage par la protéase virale (de Marco et coll., 2010). Elle intervient aussi dans les premières étapes de la réplication ainsi que dans la maturation des particules virales. La protéine P24 est composée de deux parties : une extrémité N-terminale qui intervient dans la maturation des virions et l’incorporation des protéines cellulaires et une extrémité C-terminale intervenant dans la dimérisation et les interactions gag-gag protéines (Gamble et coll., 1996). Elle est également impliquée dans l’incorporation des précurseurs Gag-Pol qui est essentielle au recrutement de la protéase, de l’intégrase et de la transcriptase inverse dans les virions

(**Huang et Martin, 1997**). Il a été démontré que des mutations dans l'extrémité C-terminale entraînent une défaillance dans la réPLICATION virale (**Chazal et coll., 1994**).

La Nucléocapside p7 (NC) est caractérisée par sa structure en doigts de zinc et par ses diverses fonctions. Cette structure en doigts de zinc est très conservée chez tous les rétrovirus à l'exception des spumavirus (**Maurer et coll., 1988**). Parmi ces fonctions, nous pouvons citer plus particulièrement son action dans l'incorporation et l'encapsidation de l'ARN viral. Elle intervient dans le cycle de réPLICATION viral pour la dimérisation, les interactions entre protéines, la reverse transcription et la stabilité du complexe génomique, comme toutes les protéines Gag (**Freed et coll., 1998**). Des mutations au niveau des résidus Histidine et Cysteine des doigts de zinc de la p7NC sont à l'origine d'un défaut d'incorporation et d'encapsidation de l'ARN viral (**Schwartz et coll., 1997**). Elle favorise ainsi l'accrochage de l'amorce de transcription, l'ARN_t^{Lys} (**Hargittai et coll., 2001**) et intervient dans la stabilisation de l'ADN viral néo-synthétisé et le processus d'intégration. La p7NC, bien que pas toujours indispensable, augmente l'efficacité de chacune de ces étapes de façon à favoriser la formation de particules virales infectieuses (**Thomas et Gorelick, 2008**).

En plus des protéines MA, CA et NC qui sont très conservées dans les différents rétrovirus, il existe une autre protéine dont les fonctions restent moins étudiées, la protéine p6. Dans le cas du VIH-1, cette protéine se situe dans l'extrémité C-terminale de Gag et une étude a démontré qu'une défaillance dans les fonctions de la P6 est à l'origine d'un défaut de libération des particules virales et des mutations dans cette région, contribuent à la libération de particules virale non infectieuses (**Göttlinger et coll., 1991 ; Votteler et coll., 2011**). La Protéine P6 ne joue pas de rôle déterminant dans l'assemblage des particules virales. Cependant, elle a la faculté d'interférer avec la machinerie cellulaire requise pour le bourgeonnement et la libération des particules virales (**Weiss et Göttlinger, 2011**).

Les peptides p1 et p2 ne sont pas uniquement des produits de clivage qui permettent la régulation de l'activité de la protéase. La p2 comprise entre les protéines de la capsid et la protéine de la nucléocapside, est essentielle à l'assemblage et à la production de particules virales infectieuses (**Guo et coll., 2005**).

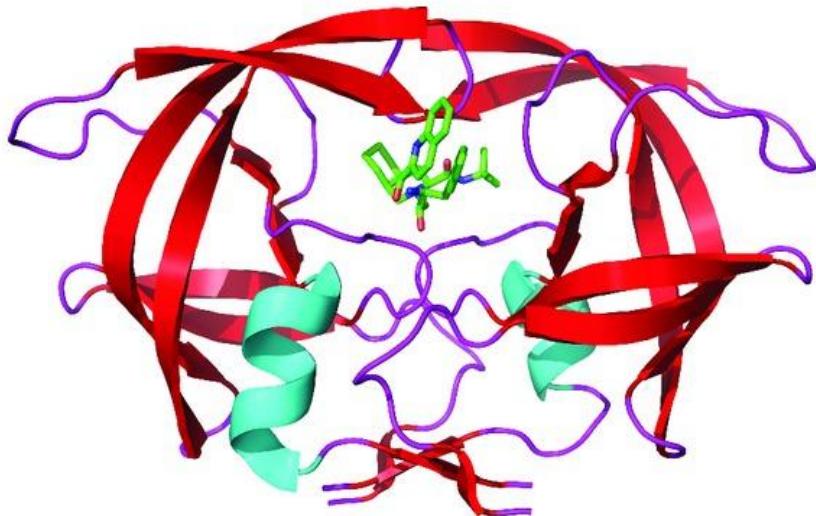
II.2.2.2. Le gène *pol* (Polymerase)

Il code pour les 3 enzymes virales, protéase (PR), transcriptase inverse (TI) et intégrase (IN) qui sont obtenues après clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol} (**Adamson, 2012**). La Pr160^{Gag-Pol} est une polyprotéine engendrée parallèlement avec le Pr55^{gag} mais en moindre quantité. Ceci

par un saut du cadre de lecture au niveau d'une structure particulière de l'ADN proviral riche en T (**Krausslich et coll., 1991**).

La protéase du VIH-1 (figure 9), joue un rôle indispensable dans le cycle de réPLICATION. Elle assure le clivage et la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol pour produire des protéines matures et fonctionnelles (**Darke et coll., 1988**). L'incorporation et la maturation de ces précurseurs Gag-Pol sont essentielles à l'activité virale car intervenant dans la synthèse et l'intégration de l'ADNc dans le génome cellulaire (**Wu et coll., 2001**). La protéase se présente comme une aspartyl-protéase qui, du point de vue structural, se présente sous forme d'un homodimère de 99 acides aminés. Elle est essentielle à la maturité de la particule virale infectieuse. C'est l'enzyme indispensable au processus post-traductionnel, c'est-à-dire le clivage des polyprotéines Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} (**Miller et coll., 1989**).

L'activité enzymatique est assurée par deux molécules d'acide aspartique situées au cœur du site catalytique de l'enzyme constituée par la triade Asp-Thr-Gly aux positions 25 à 27 (**Copeland et Oroszlan, 1988**). Cette triade conservée se trouve dans la jonction des deux monomères. Elle forme ainsi un tunnel, permettant une interaction avec 7 à 9 acides aminés, dont l'activité aboutit au clivage de 9 séquences peptidiques différentes. Cela aboutit à la synthèse des protéines P17, P24, P6 et P7, à partir du gène *gag*, et des enzymes (protéase, transcriptase inverse et intégrase) à partir de la polyprotéine Gag-Pol. Ce clivage semble s'effectuer à des sites bien précis de ces protéines, grâce à l'affinité qui diffère d'un site à l'autre (**Pettit et coll., 1993**). La protéase est une des cibles de la thérapeutique antirétrovirale. Les molécules ou inhibiteurs de cette famille ont donc une forte affinité pour le site actif de la protéase, dont elles inhibent l'activité enzymatique de manière irréversible (**Boden et Markowitz, 1998**).

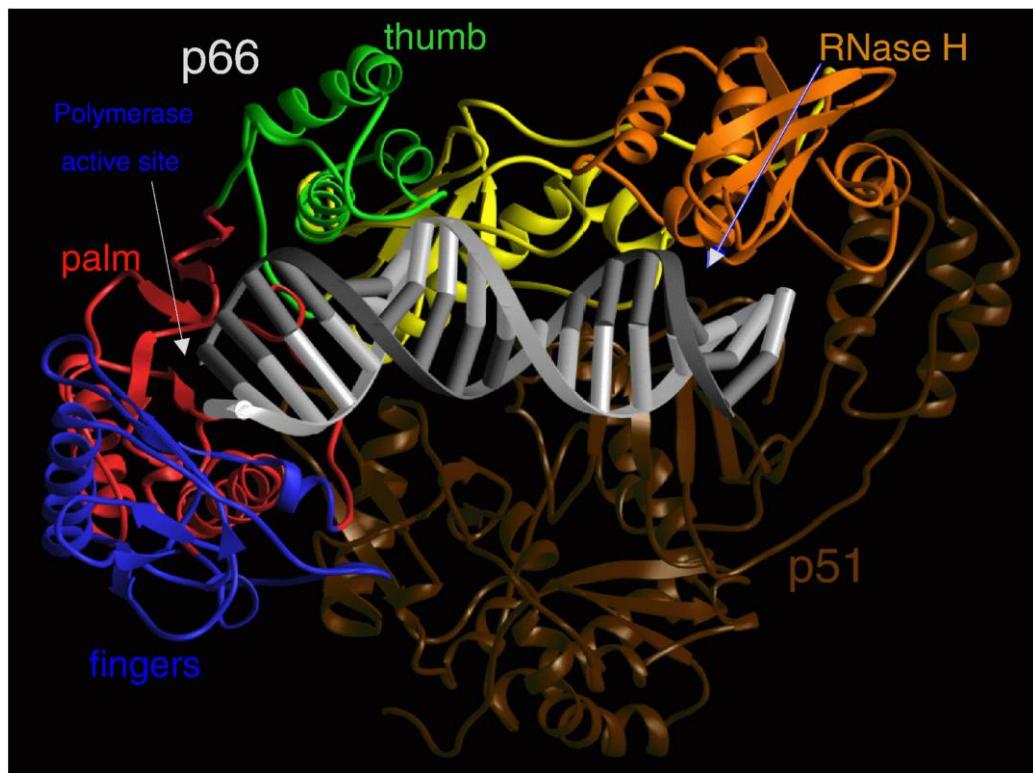


Les deux monomères, représentés en rouge, sont liés de façon non covalente et symétrique par 4 chaînes β -antiparallèles, en violet et le site actif de l'enzyme est matérialisé en vert.

Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 (Adamson, 2012)

La transcriptase inverse du VIH-1 (figure 10), comme chez tous les *lentivirus*, est codée par le précurseur Pr160^{Gag-Pol} durant la maturation et le bourgeonnement des particules virales. Le précurseur Pr160^{Gag-Pol} est tout d'abord clivé par la protéase virale pour donner une unité de 66 KDa, la P66. Ensuite, cette P66 subit un autre clivage dans sa partie C-terminale pour fournir une autre sous unité de 51 KDa appelée : P51. Ces deux sous unités P51/P66 déterminent la structure en hétérodimère de la transcriptase inverse (**Cases-González et Menéndez-Arias, 2005**). La P66, d'une longueur de 560 acides aminés, comprend les deux domaines fonctionnels de la TI que sont la polymérase et le domaine RNase H, essentiels à la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN double brin avant son intégration dans le génome cellulaire (**Sarafianos et coll., 2009**). Le domaine polymérase de la P66 (ressemblant à une main droite) est lui-même divisé en 4 sous-domaines dénommés « doigts », « pouce », « paume » et un sous-domaine de connexion liant les domaines polymérase et RNase H (**Kohlstaedt et coll., 1992**). La RNase H représente la partie C-terminale de la P66, d'une longueur de 120 acides aminés, a pour rôle d'hydrolyser le brin d'ARN à partir de l'hybride ARN/ADN formé après synthèse du brin d'ADN complémentaire par la transcriptase inverse. Son activité est modulée par la sous-unité P51, probablement via des interactions avec le domaine catalytique de la RNase H au niveau de la P66 (**Bochner et coll., 2008**). La petite sous-unité, P51, contient les 440 premiers acides aminés de la P66 correspondant, mais pas totalement au domaine de la polymérase. Bien que la sous-unité P51 contienne les mêmes

quatre sous-domaines retrouvés dans le domaine polymérase de la P66, les relations physiques entre les sous-domaines sont différentes (**Sarafianos et coll., 2009**). En effet, malgré la présence dans le P51 des trois acides aminés (Asp 110, Asp 185 et Asp 186) du site catalytique du domaine polymérase (au niveau de la paume), il n'y a pas d'activité de polymérase fonctionnelle au niveau de la petite sous-unité (**Mulky et coll., 2004**). La fonction primaire de la P51 serait donc de maintenir la structure active de la P66 (**Freed et coll., 2001**). La p51 intervient aussi dans la fixation du tRNA^{lysA} comme amorce et dans l'initiation de la rétrotranscription (**Hottiger et coll., 1994**). La figure 10 ci-dessous représente les différentes unités de la transcriptase.



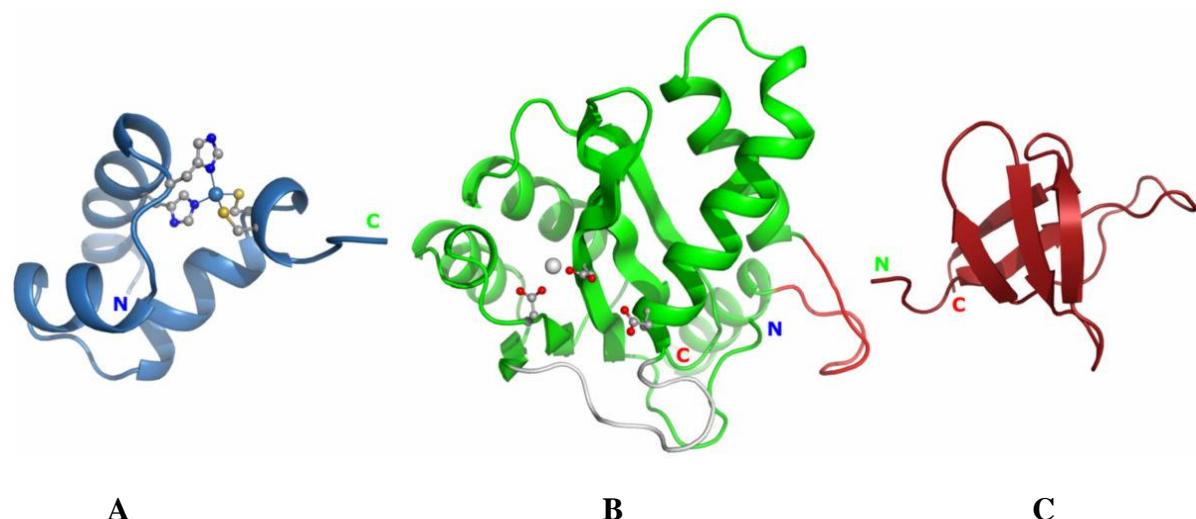
Les sous-domaines de la sous-unité p66 sont colorés en bleu pour les doigts, rouge pour la paume, vert pour le pouce, jaune pour le domaine de connexion et orange pour la RNase H. La sous-unité p51 est en marron foncé et l'acide nucléique est en gris. Le site actif de la polymérase est indiqué par une flèche.

Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la transcriptase inverse du VIH-1 (Sarafianos et coll., 2009)

L'intégration de l'ADN viral néoformé dans le génome cellulaire, assurée par l'intégrase virale est d'une importance capitale dans la réplication virale (**Vink et coll., 1993**). Cette étape clé du cycle de multiplication du virus est devenue depuis peu la cible de nouvelles

molécules ARV (**Dyda et coll., 1994**). L'intégrase (figure 11) est une protéine de 32 kDa, obtenue par clivage protéase-dépendante de la polyprotéine Gag-Pol et composée de trois domaines structuraux et fonctionnels que sont :

- un domaine N-terminal avec un motif en doigt de zinc (de type HH-CC) (**Zheng et coll., 1996**),
- un domaine central ou domaine catalytique impliqué dans la liaison avec les extrémités de l'ADN viral avec son motif D, D-35-E qui est très conservé chez tous les rétrovirus (**Fayet et coll., 1990**). Ce domaine contient aussi un site catalytique caractérisé par ces trois résidus : D64, D116 et E152 (**Chen et coll., 2000**),
- et un domaine C-terminal qui lie l'ADN viral de façon non spécifique et qui participe essentiellement à la stabilité du complexe ADN-IN (**Eijkelenboom et coll., 1995**).

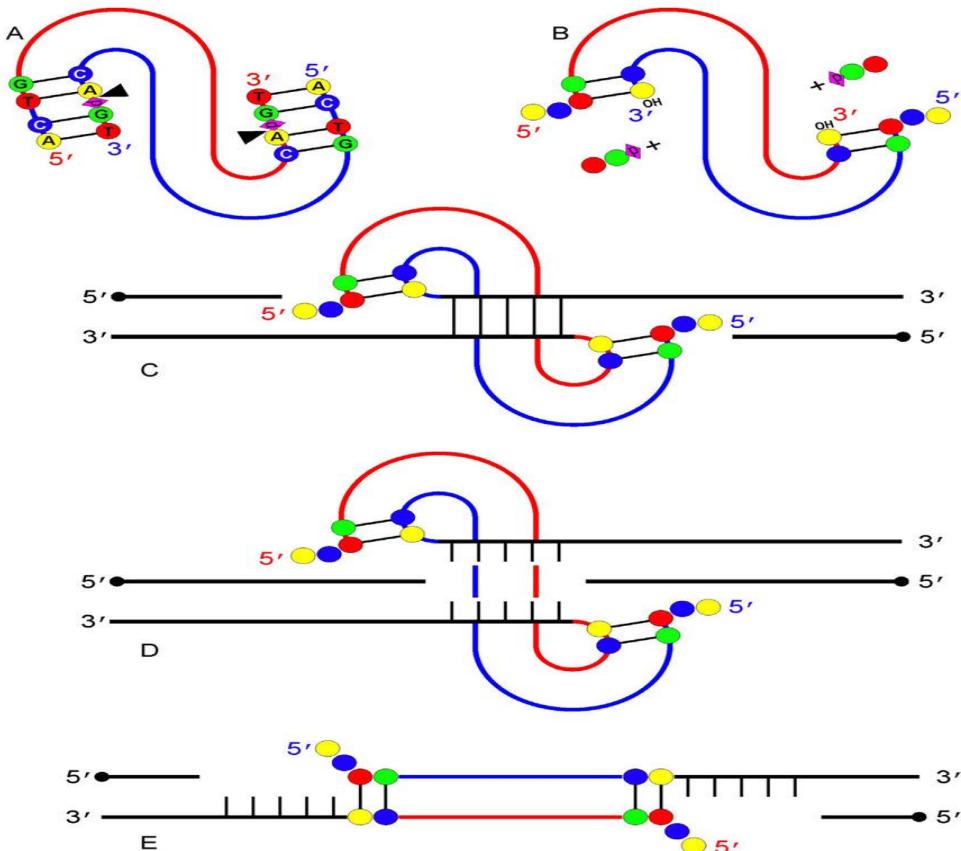


Le domaine N-terminal en bleu (A), le domaine central en petites boules rouge (B) et le domaine carboxy-terminal en rouge (C). N et C respectivement pour N-terminal et C-terminal.

Figure 11 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH (Jaskolski et coll., 2009)

La figure 12 ci-dessous montre les différentes étapes de l'intégration de l'ADN viral par l'intégrase grâce à ces deux activités catalytiques majeures : un premier clivage s'effectue au niveau des extrémités 3'-OH du génome viral et ensuite l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire cible. Nous avons ensuite un recouplement entre l'extrémité 5' de l'ADN cellulaire et celle 3'-OH de l'ADN au moment de l'intégration. La fin de l'intégration est caractérisée par la libération des nucléotides non fixés dans l'extrémité 5', la réparation des

gaps et l'appariement entre l'ADN virale et cellulaire. Ce mécanisme est assuré par des enzymes d'origine cellulaires (**Brown et coll., 1989**).



- étape A-B, ligase de deux nucléotides GT au niveau des extrémités 3' afin de libérer une molécule OH dans chaque extrémité,
- étape B-C, ligase de l'ADN cellulaire en 5' et intégration de l'ADN viral par son extrémité 3'OH tout en gardant la polarité de l'ADN,
- étape D-E, c'est la fin de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Cette étape est caractérisée par l'élimination des gaps et brins non complémentaires pour donner un produit fini montrant l'ADN viral bien intégré avec ses extrémités GT bien conservées en extrémités 5'

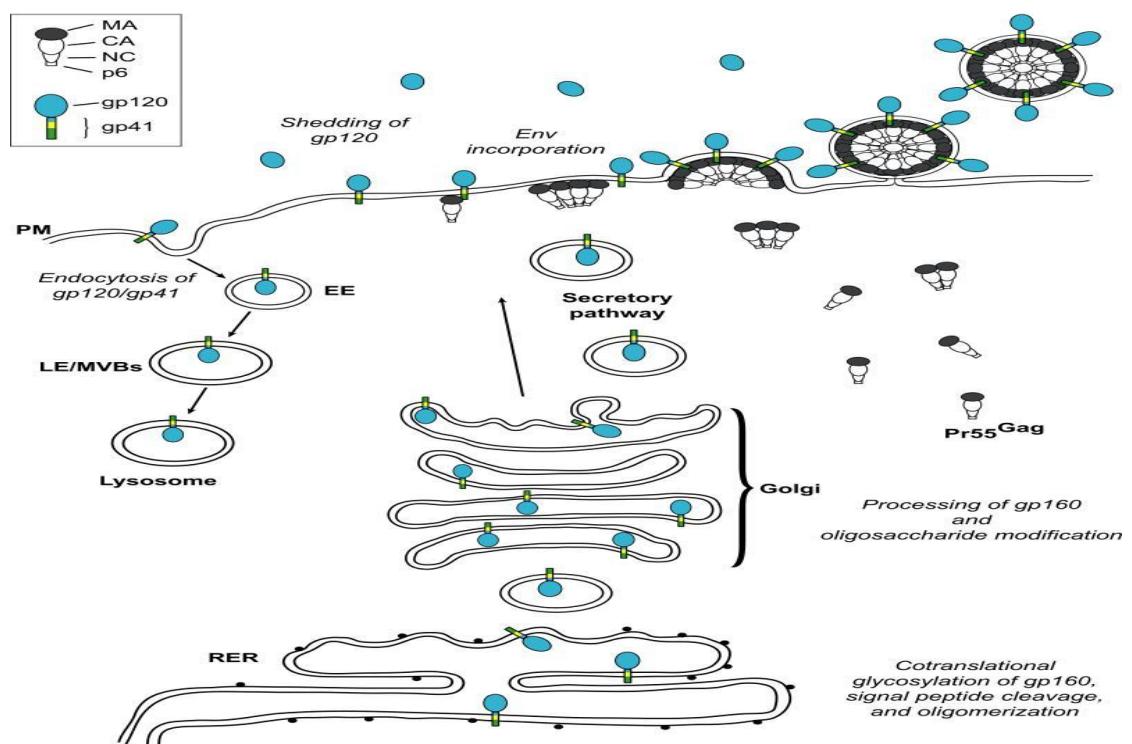
Figure 12 : Représentation de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire
(Jaskolski et coll., 2009)

II.2.2.3. Le gène *env* (envelope)

Le gène *env* qui code pour la seule et unique glycoprotéine exprimée à la surface des virus et nécessaire à la fusion puis l'entrée du virus dans sa cellule hôte (**Arrildt et Joseph, 2012**). La glycoprotéine Env est synthétisée sous la forme d'un précurseur protéique fortement glycosylé d'environ 845 à 870 acides aminés (**Pancera et coll., 2005**), la gp160, qui sera clivée par la protéase cellulaire pour donner une glycoprotéine de surface gp120 (SU) et une

glycoprotéine transmembranaire gp41 (TM) (**Chechley et coll., 2011**). La gp120 et la gp41 restent associées par des liaisons non covalentes et sont transportées vers les membranes où elles sont incorporées dans les virions lors du bourgeonnement. Elles forment les spicules du VIH-1 et sont responsables de la liaison avec les récepteurs pour l'entrée du virus dans la cellule hôte. Elles sont ainsi les cibles idéales pour les anticorps neutralisants (**Pancera et coll., 2005**). Matures et fonctionnelles, elles se présentent sous forme de trimères d'hétérodimères gp120-gp41 à la surface du virus (**Zhu et coll., 2003**). La gp120 contient le domaine de liaison qui lui permet de se lier au récepteur CD4 et au corécepteur (récepteur de chimiokines, CCR5 ou CXCR4) sur la cellule cible ; la gp41 contient le domaine de trimérisation et est responsable de la fusion des membranes virales et cellulaires (**Miyauchi et coll., 2009**).

La figure 13 ci-dessous montre le mécanisme de synthèse des glycoprotéines d'enveloppe à savoir la gp120 et gp41.



La synthèse commence au niveau du réticulum endoplasmique rugueux par une étape d'oligomérisation pour donner la gp160. Cette dernière sera par suite clivée par la protéase cellulaire en gp120 et gp41 qui seront transportées au niveau du golgi sous forme de lysosomes pour subir d'autres étapes de glycosylation. L'endocytose de ces lysosomes va contribuer à la libération de ces glycoprotéines liées de façon non covalente (gp120- gp41) et fixées au niveau de la membrane plasmique. Elles vont ensuite, avec la membrane plasmique, former l'enveloppe des virus nouvellement synthétisés par une étape de bourgeonnement (**Land et Braakman, 2001 ; Chechley et coll., 2011**).

Figure 13 : Mécanisme de synthèse des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41
(Chechley et coll., 2011)

La glycoprotéine de surface gp120 (SU) (figure 14) est composée d'environ 480 acides aminés, neuf ponts disulfures et contient 20 à 24 sites de N-glycosylation qui contribuent à la moitié de sa masse moléculaire (**Leonard et coll., 1990**). Elle est organisée en cinq régions constantes dont les séquences sont semblables parmi les différentes souches virales (C1-C5) et cinq régions variables qui diffèrent considérablement entre les souches, appelées boucles variables (V1-V5). Les régions variables sont ancrées à leur base par des ponts disulfures et masquent les sites de liaison du récepteur CD4 et des corécepteurs, CXCR4 ou CCR5 (**Leonard et coll., 1990; Pancera, 2005**). L'interaction gp120-gp41 est responsable d'un changement important de conformation au sein de la gp120 qui déplace les boucles V1/V2 pour faire apparaître le site de liaison du corécepteur CCR5 ou CXCR4. Un changement de conformation au niveau de la boucle V1/V2 est à l'origine d'une augmentation du degré d'affinité au niveau des liaisons induisant le CCR5 comme corécepteur (**Kolchinsky et coll., 2001**). Des éléments de la boucle V3 et certains résidus de la région C4 participent à la formation de ce site (**Ashish et coll., 2006**). La boucle V3 est responsable du tropisme du virus car c'est elle qui détermine le choix du récepteur aux chimiokines, CCR5 ou CXCR4 (**Speck et coll., 1997**). Elle peut aussi empêcher l'entrée du virus dans la cellule hôte par la formation d'un syncytium entre les cellules qui expriment les glycoprotéines d'enveloppe et d'autres qui contiennent le récepteur CD4 et un corécepteur spécifique (CCR5 ou CXCR4) (**Verrier et coll., 1999**). D'un point de vue antigénique, la gp120 induit la synthèse d'anticorps dirigés contre les sites conservés de liaison du récepteur et des corécepteurs, qui sont des cibles évidentes pour les anticorps neutralisants. Cependant, les boucles variables peuvent aussi induire efficacement des anticorps neutralisants. Il a été démontré que des délétions au niveau de cette boucle conduisent à une diminution de l'activité fonctionnelle des protéines Env et une altération du tropisme mettant en jeu le corécepteur CXCR4 (**Yang et coll., 2004**).

La glycoprotéine gp41 (TM) (figure 14), composée d'environ 345 acides aminés et composée de trois domaines principaux : un domaine extracellulaire (512 à 683 acides aminés), un domaine transmembranaire (TM, 684 à 705 acides aminés) et une région cytoplasmique, située à l'intérieur de la membrane virale (CT, 705 à 856 acides aminés) (**Gabuzda et coll., 1992 ; Arrildt et Joseph, 2012**). Le domaine extracellulaire contient un domaine N-terminal fusogenique (FP), promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte et d'autres régions comme : HR1, HR2 et MPER (**Chechley et coll., 2011**). Le FP est lié aux régions hydrophobes des extrémités N-terminale de la gp120SU par des liaisons non

covalentes (**Pancera, 2005**). La fusion membranaire est sous la dépendance de ce peptide de fusion qui va s'insérer dans la membrane cellulaire après la liaison de la gp120 avec les récepteurs, mais également d'un changement de conformation au niveau des régions HR1 et HR2 qui permet de rapprocher les membranes virales et cellulaires (**Chechley et coll., 2011**). La région HR1, qui contient une hélice nommée N36, est responsable de la trimérisation de la gp41 (**Chan et coll., 1997**). Après la fusion de la gp41 à la cellule hôte, la région HR2 vient se positionner de façon antiparallèle dans les sillons du faisceau d'hélice formé par le HR1. Ces régions, HR1 et HR2, sont impliquées dans la fusion des membranes virales et cellulaires (**Pancera, 2005**). Le MPER intervient dans le degré de virulence des virus et la région cytoplasmique (CT) est impliquée dans l'endocytose et l'internalisation des protéines Env (**Chechley et coll., 2011**). La région CT montre qu'elle est composée de plusieurs motifs que sont : YSPL, KS, LLP-2, LLP-3 et LLP-1. Ces différents motifs interviennent dans la stabilité des protéines Env (**Lee et coll., 2002**), l'incorporation et l'expression des protéines à la surface de la membrane cellulaire (**Piller et coll., 2000**).

Du point de vue antigénique, la gp41 induit la formation d'anticorps non neutralisants au niveau de la boucle immuno-dominante et de l'extrémité N-terminale du HR2 (**Chechley et coll., 2011**) mais aussi des anticorps neutralisants dirigés contre la région de l'ecto-domaine proche de la membrane (**Montero et coll., 2008**).

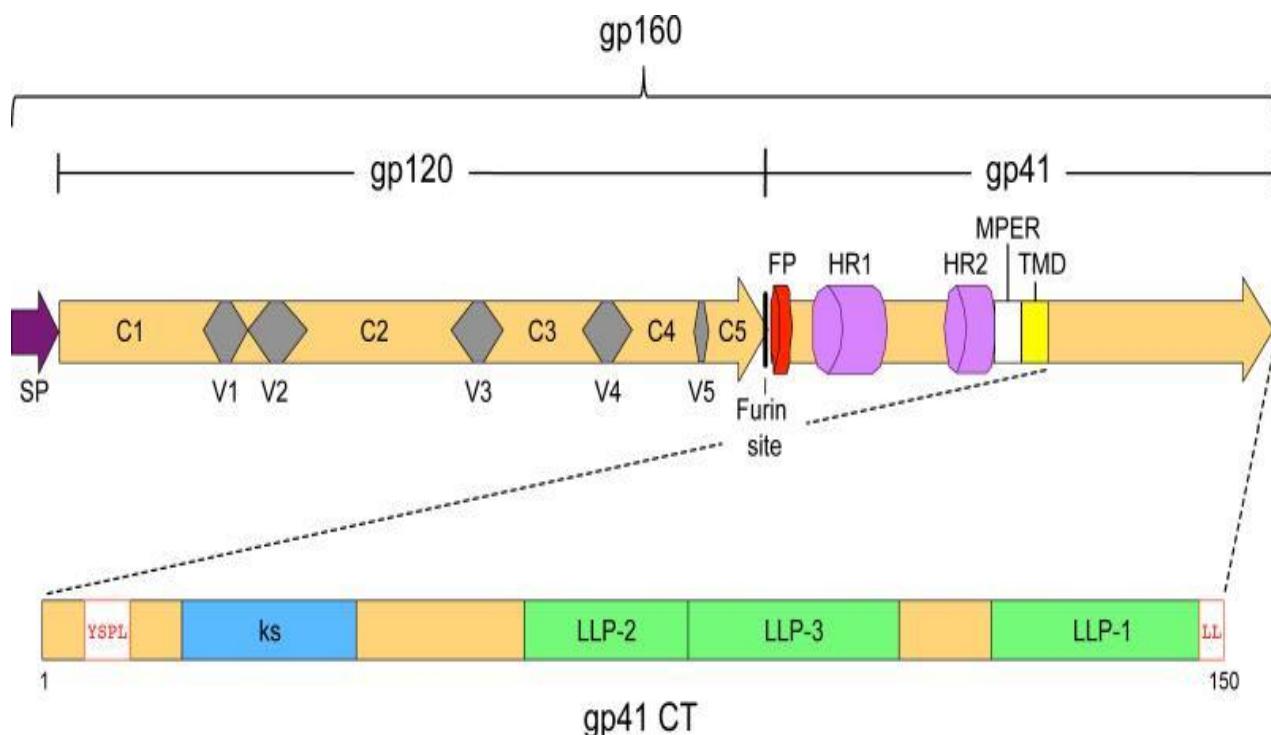


Figure 14 : Représentation structurale des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41
(Chechley et coll., 2011)

II.2.3. Les gènes régulateurs

En plus des gènes de structure (*gag*, *pol* et *env*) cités ci-dessus, le VIH-1 code pour des gènes dits régulateurs (*tat* et *rev*) dont leurs produits sont chargés d'établir des interaction complexes entre le virus et la cellule hôte (Zuo et coll., 2006). Les gènes et protéines de structure sont identiques à tous les *lentivirus*. Cependant, les protéines des gènes régulateurs sont uniquement retrouvées chez les primates (Nomaguchi et coll., 2012).

II.2.3.1. Le gène *tat* (trans-activator of transcription)

Le gène *tat* (figure 15) est codé par deux exons et composé de cinq régions. Il code pour une petite protéine de 86 à 101 acides aminés (Zhou et Sharp, 1995). Les acides aminés de 1 à 72, constituent le premier exon qui est subdivisé en quatre régions dont les trois premiers constituent le domaine d'activation de la protéine Tat, capable de se lier à la cycline T1 (Tahirov et coll., 2010). Domaine I est riche en Proline et le domaine II en Cystéine. Le domaine III intervient dans la liaison avec les facteurs cellulaires comme la cycline T1 ou SP1 et le domaine IV hautement basique intervient dans la liaison avec TAR et domaine V qui correspond au 2^{ème} exon (Liang et Wainberg, 2002). Le second exon, résidus 73 à 86, n'a pas une fonction primaire dans la transcription mais peut avoir d'autres fonctions lors de la réPLICATION virale (Romani et coll., 2010).

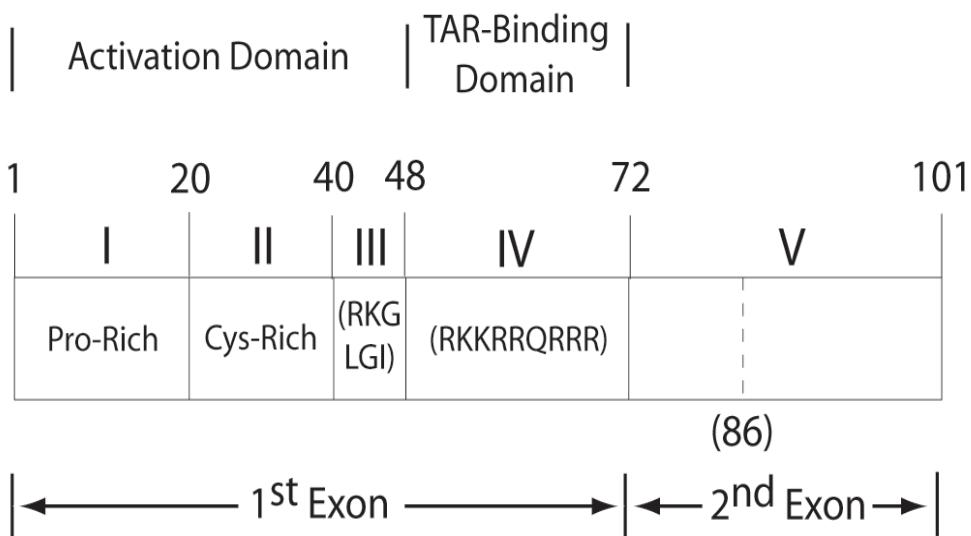


Figure 15 : Domaines fonctionnels de la protéine Tat (Liang et Wainberg, 2002)

Les protéines Tat ont été les premières à être identifiées comme étant des protéines régulatrices et essentielles à la réPLICATION virale par leur capacité d'augmenter l'expression des gènes du VIH-1 (**Fisher et coll., 1986**). La protéine Tat intervient plus particulièrement comme agent régulateur de l'elongation avec le cofacteur P-TEFb qui est composé de la cycline T1 et la sous unité Cdk9 (**D'Orso et Frankel, 2010**). La protéine Tat interagit avec l'élément TAR du leader RNA pour exercer son action favorisante de l'elongation pendant la réPLICATION virale (**Marshall et Price, 1992**). L'interaction entre Tat, l'élément TAR et le cofacteur P-TEFb entraîne une hyperphosphorylation au niveau de la région C-terminale de l'ARN polymérase II favorisant ainsi son activité dans le cycle viral (**Parada et Roeder, 1996**). La protéine Tat peut agir comme une toxine virale contribuant à la pathogenèse du SIDA tel que le sarcome de Kaposi (**Ensoli et coll., 1990**). Elle est responsable de l'infectiosité des cellules dites réservoirs et constitue un facteur d'échec au traitement antirétroviral (**Ramratnam et coll., 2000**). La protéine Tat, sécrétée par les cellules infectées, peut non seulement activer la transcription de ces cellules en état de latence, mais aussi induire l'apoptose des cellules voisines non infectées (macrophages, lymphocytes T) qui sont essentielles à la réponse immunitaire (**Westendorp et coll., 1995**). Elle aurait également une activité, très largement controversée, de régulation sur la transcription inverse de l'ARN en ADNc (**Kameoka et coll., 2002**). Tat bloquerait la transcription inverse prématuée qui pourrait survenir avant la formation de particules virales matures en s'associant aux molécules d'ARN néoformées. Ceci permet d'assurer l'intégrité des molécules d'ARN à incorporer dans les futures particules virales en empêchant leur dégradation précoce par l'activité RNase H associée à la RT (**Liang et Wainberg, 2002**). Une étude a aussi mis en évidence une possibilité de méthylation de Tat au niveau des résidus de lysine 50 et 51 qui aurait comme conséquence une réduction des interactions entre TAR et la cycline T1 pour atténuer son rôle dans la transcription (**Van Duyne et coll., 2008**). Tat supprimerait également l'elongation de l'ADN non spécifique dans la phase tardive de la transcription inverse mais favoriserait l'hybridation de l'amorce ARN_t^{Lys} au niveau du *primer binding site* sur la matrice d'ARN au cours des étapes précoces de la transcription inverse (**Kameoka et coll., 2002**).

II.2.3.2. Le gène *rev* (regulator of expression virus)

C'est le second gène régulateur nécessaire à l'expression des virus. Il code pour une protéine de 116 acides aminés et exprimée durant la phase précoce de la réPLICATION virale (**Malim et coll., 1989**). Elle s'accumule dans le nucléole de la cellule hôte et intervient dans la régulation post transcriptionnelle des gènes de structure en assurant le transport des transcrits primaires

du noyau au cytoplasme (**Daly et coll., 1989**). La figure 16 montre la structure de la protéine Rev avec trois motifs fondamentaux : deux motifs d'oligomérisation séparés par un motif riche arginine et un dernier dénommé NES (Nuclear Export Sequence). Le motif riche en arginine présente une très grande affinité pour les interactions Rev-RRE (**Battiste et coll., 1996**). Les oligomérisations au niveau du dit motif permettent à la protéine Rev de former un complexe de nucléoprotéine (**Malim et coll., 1989**) qui va assurer les exportations nucléaires de l'ARN viral et des ARNm à travers le NES (**Suhasini et Reddy, 2009**). Le site de reconnaissance de la protéine sur l'ARN est le domaine RRE (Rev Responsive Element) qui est une séquence du gène *env*, et ce sont plusieurs monomères de Rev qui vont de façon séquentielle se lier au RRE. L'association de ces monomères de Rev au domaine RRE régule l'exportation de l'ARN viral du noyau vers le cytoplasme et des ARNm partiellement épissés, codant pour les protéines structurales de virus (**Pond et coll., 2009**). A côté de cette activité régulatrice de l'expression de gènes, la protéine Rev pourrait intervenir dans l'intégration de l'ADN proviral en contrôlant l'activité de l'intégrase. Deux courts peptides à savoir les résidus 13-23 et 53-67 sont impliqués dans l'interaction entre Rev-Intégrase pour inhiber l'activité enzymatique de ce dernier et interférer ainsi dans la réplication virale (**Rosenbluh et coll., 2007**). La protéine LEDGF/p75 (Lens epithelium-derived growth factor/p75) est aussi un facteur essentiel dans l'intégration de l'ADN proviral grâce à son interaction avec l'intégrase. Cependant, la protéine Rev entre en compétition avec l'intégrase au niveau du même site de fixation sur la protéine LEDGF/p75. Cela détermine ainsi un ménage à trois qui régule la fréquence d'intégration de l'ADN proviral pendant la réplication. L'association de Rev avec la protéine LEDGF/p75 à la place de l'intégrase limitera l'intégration de l'ADN d'un nouveau virus dans le cas des surinfections (**Grewe et Uberla, 2010**). Il a été aussi démontré que la mutation M10 au niveau de Rev peut inhiber les fonctions de cette dernière durant la phase tardive de la réplication virale (**Levin et coll., 2010**). Elle jouerait également un rôle de régulateur dans la traduction des ARN (**Groom et coll., 2009**) et dans le processus d'encapsidation de l'ARN (**Brandt et coll., 2007**).

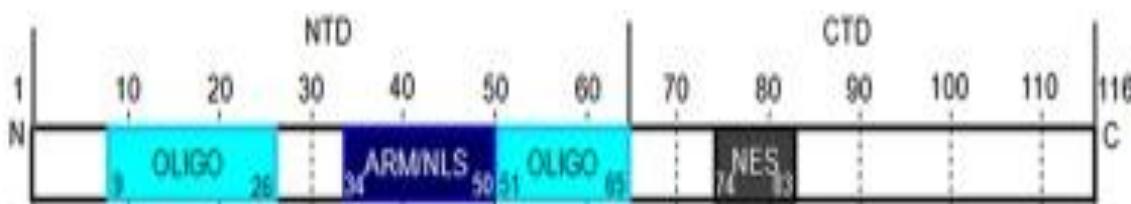


Figure 16 : Domaines d'organisation de la protéine Rev (Dimattia et coll., 2010)

II.2.4. Les gènes accessoires

Ils forment le troisième et dernier groupe de gènes fonctionnels codés par le génome du VIH-1 avec les gènes de structure et les gènes régulateurs (**Zuo et coll., 2006**). Ces gènes accessoires jouent un rôle important dans les interactions virus-hôte et ont un fort impact dans les conséquences de l'infection à VIH. Par conséquent, la présence ou l'absence des protéines de ces gènes accessoires peut considérablement modifier le cours et la gravité de l'infection virale (**Li et coll., 2005**).

II.2.4.1. Le gène *vif* (virion infectivity factor)

Le gène *vif*, découvert dans les années 1980 a été initialement dénommé *sor* et par la suite renommé *vif*. Il code pour une protéine basique de 23kD qui intervient dans l'infectiosité des particules virales (**Strebel et coll., 1987**). En l'absence de la protéine Vif, les particules virales produites sont défectueuses alors que la transmission des virus d'une cellule à une autre n'est pas significativement affectée. Cette protéine existe à des taux élevés et sous une forme libre dans le cytosol (**Li et coll., 2005**). La protéine Vif est requise pendant la multiplication des cellules exprimant un facteur antiviral dénommé APOBEC3G. Ce dernier est une cytidine désaminase qui, en entraînant la désamination des desoxycytidine, va induire la formation d'ADN contenant un codon stop et qui va être éliminé par la machinerie cellulaire (**Zhang et coll., 2003**). Cependant, le virus a mis en place une stratégie pour supprimer l'action antivirale de l'APOBEC3G. La protéine Vif, en se liant directement à APOBEC3G, favorise sa dégradation par le recrutement d'une ligase spécifique appelée E3 (**Conticello et coll., 2003**).

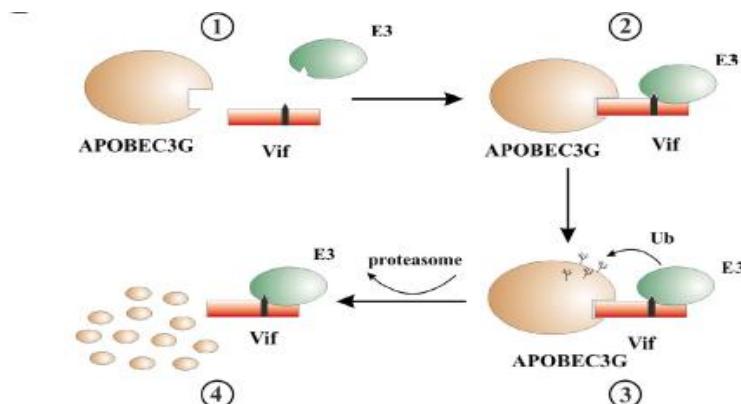


Figure 17 : Mécanisme de la dégradation de l'APOBEC3G induite par la protéine Vif
(**Goila-Gaur et Strebel, 2008**)

La figure 17 ci-dessus montre le mécanisme de la dégradation de l'APOBEC3G par la formation d'un complexe APOBEC3G-Vif-E3 (**Goila-Gaur et Strelbel, 2008**). Les cellules exprimant l'APOBEC3G sont appelées cellules non permissives et comprennent les lymphocytes T et les macrophages, qui diffèrent des cellules dites permissives (**Gabuzda et coll., 1992**).

Nous avons ici représenté dans la figure 18 ci dessous, l'impact de l'interaction Vif-APOBEC3G dans la réPLICATION virale chez les cellules non permissives.

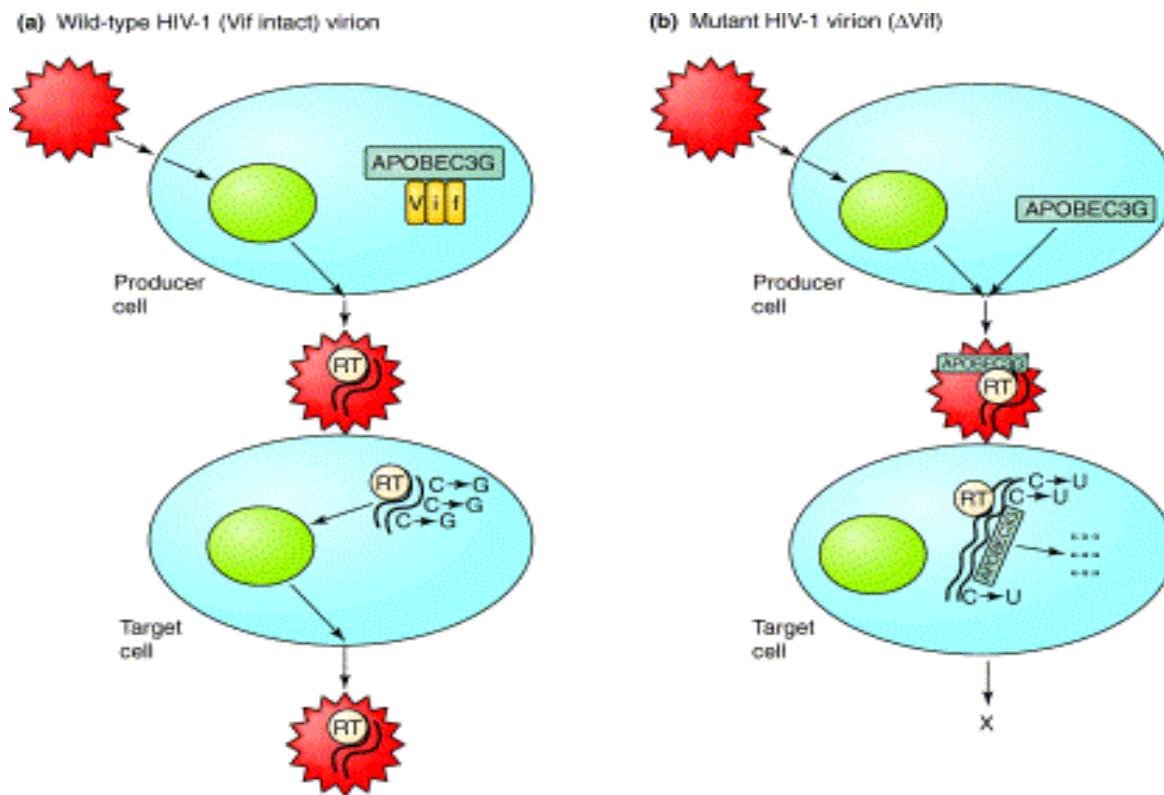


Figure 18 : Interaction Vif-APOBEC3G dans la réPLICATION du VIH-1 chez les cellules non permissives (Argyris et Pomerantz, 2004)

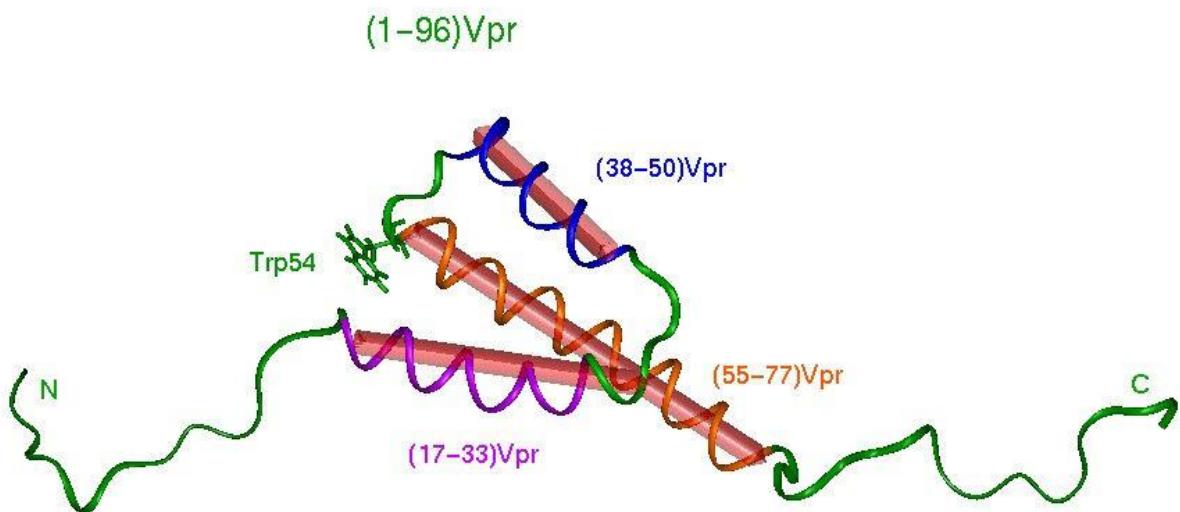
Cette figure montre que la protéine Vif, par sa capacité de dégrader l'APOBEC3G, empêche son encapsidation dans le génome viral et permet ainsi au virus de se répliquer convenablement (**Argyris et Pomerantz, 2004**).

Il a été démontré que l'incorporation de l'APOBEC3G dans le génome viral est facilitée par l'interaction avec NCp6 du précurseur gag (**Schäfer et coll., 2004**). D'autres auteurs ont aussi rajouté l'autre sous unité de gag, la NCp7 dans les interactions avec APOBEC3G pour inhiber la transcription inverse lors de la réPLICATION virale (**Guo et coll., 2007**).

Vif est encapsidé de façon spécifique dans les particules virales et interviendrait tardivement dans la réPLICATION en modulant les étapes d'assemblage et/ou de maturation en interagissant de façon spécifique avec la protéase virale (**Guo et coll., 2007**). Elle joue également un rôle dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique par une interaction avec l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Elle régule aussi la transcription inverse grâce à son extrémité C-terminale en stimulant l'activité de la TI ou en favorisant son degré de polymérisation (**Cancio et coll., 2004**).

II.2.4.2. Le gène *vpr* (viral protein R)

Le gène *vpr* (figure 19) code pour une petite protéine de 14 KDa constituée de 96 acides aminés et retrouvée dans le noyau ou incorporée dans l'enveloppe nucléaire des cellules infectées (**Le Rouzic et coll., 2002**). L'incorporation de la protéine Vpr dans la particule virale nécessite l'interaction de la région p6 des précurseurs p55 Gag (**Bachand et coll., 1999**).



La protéine Vpr est constituée de :

- trois régions sous forme d'alpha hélice constituées respectivement des acides aminés 17-33, 38-50 et 55-77 et situées autour d'un noyau hydrophobe,
- Une extrémité N-terminale chargée négativement et celle chargée positivement, la C-terminale, délimitent les trois régions en alpha hélice.

Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr du VIH-1 (Morellet et coll., 2003)

Malgré sa petite taille, la protéine Vpr joue plusieurs rôles durant le processus de la réPLICATION virale (figure 20). Parmi ces rôLES essentiels, nous pouvons citer :

- un effet sur la modulation de la transcription inverse : en plus de son rôle dans l'initiation de transcription inverse, Vpr module la survenue des erreurs ou mutations occasionnées par la transcriptase inverse (**Stark et Hay, 1998**),
- l'importation de l'ADN viral comme composant du complexe de pré-intégration : la protéine Vpr présente une grande affinité avec les pores nucléaires car faisant partie du complexe de pré-intégration, ce qui facilite l'importation de l'ADN viral dans le noyau à travers ces pores nucléaires (**Fassati et coll., 2003**),
- une action cytotoxique induisant l'apoptose, qui est un processus homéostatique utilisé par les organismes multicellulaires pour éliminer certaines cellules d'où une perturbation architecturale ou fonctionnelle des tissus concernés (**Danial et Korsmeyer, 2004**). La protéine Vpr a été identifiée comme agent provoquant l'apoptose par le stress intracellulaire (**Muthumani et coll., 2002**),
- et une action activatrice de la LTR du VIH-1 ainsi que l'expression des gènes de la cellule hôte (**Le Rouzic et Benichou, 2005**).

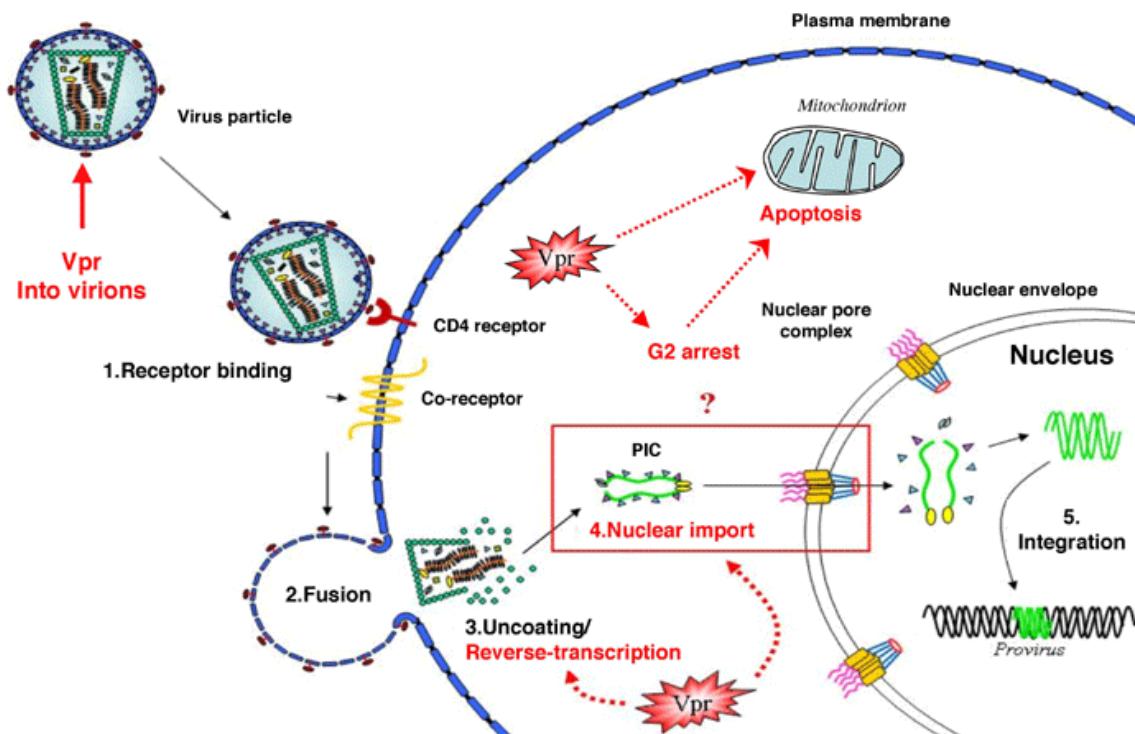
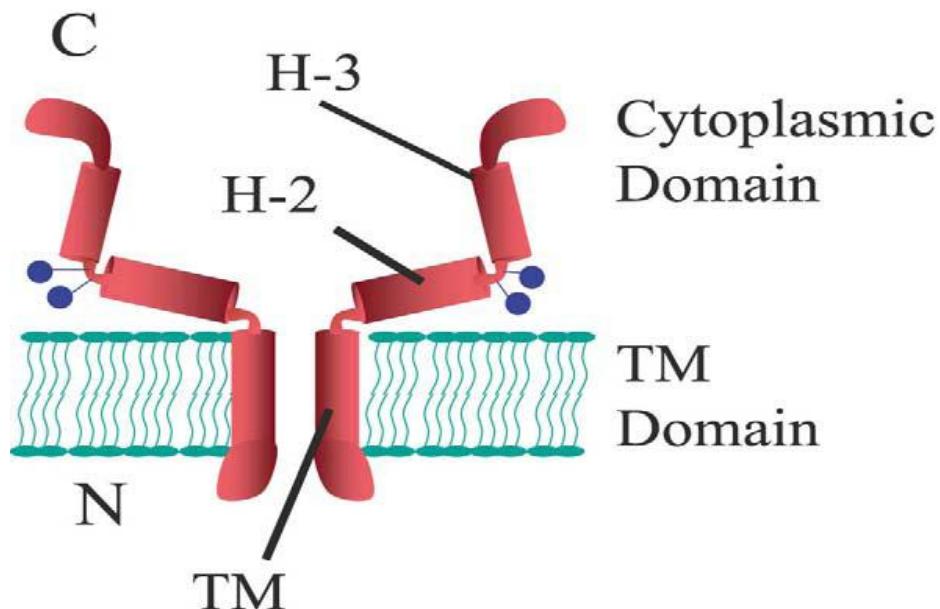


Figure 20 : Les différentes fonctions de la protéine Vpr dans la réPLICATION virale (Le Rouzic et Benichou, 2005)

II.2.4.3. Le gène *vpu* (viral protein U)

Dans les années 1988, une protéine dont on ignorait encore le nom a été identifiée, d'une longueur de 81 acides aminés et d'un poids moléculaire de 9kD (**Strebel et coll., 1988**). Cette protéine est ensuite dénommée Vpu et codée par le gène viral (*vpu*) retrouvé chez le VIH-1 et les SIV (**Cohen et coll., 1988**). La figure 21 ci-dessous, nous montre la structure de la protéine Vpu.



La protéine Vpu est composée de sites de phosphorylation (Ser-52 et Ser-56) qui sont matérialisés sous forme de petites boules bleues et plusieurs régions dénommées hélices. Nous avons la région N-terminale (hélice 1), H-2 et H-3 respectivement hélice 2 et 3 et enfin, une partie C terminale aussi sous forme d'hélice. La région N-terminale constitue la partie transmembranaire (TM) et les autres régions, la partie C-terminale.

Figure 21 : Représentation de la structure de la protéine Vpu (Fischer, 2003)

La protéine Vpu a été identifiée comme ayant deux fonctions principales. La première sous forme d'interactions protéine-protéines et la deuxième sous forme de canal ionique. La première fonction constitue la régulation négative du nombre de CD4 et la seconde se résume à l'assemblage et la libération des particules virales (**Fischer, 2003**). Les sites de phosphorylation Ser-52 et Ser-56 ne sont pas essentiels à la fixation de la protéine à la molécule CD4. Cependant, ces éléments permettent la localisation du complexe Vpu-CD4 lors de sa dégradation par les protéosomes (**Tiganos et coll., 1997**). La région responsable de la liaison Vpu-CD4 se trouve dans la partie C-terminale et correspond aux résidus 28-47 et 76-81 (**Margottin et coll., 1996**). La protéine Vpu synthétisée durant la phase tardive de la réPLICATION intervient dans la dégradation des nouvelles molécules de CD4 au niveau du

réticulum endoplasmique grâce aux protéosomes (**Schubert et coll., 1998**). Le mécanisme par lequel Vpu induit la dégradation des CD4 est différent du processus de l'ERAD (Endoplasmic Reticulum associated Degradation) (**Meusser et Sommer, 2004**). Une autre protéine appelée CD74, faisant partie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) interagit avec la protéine Vpu. Cette hypothèse montre que Vpu a aussi un rôle d'atténuation de la réponse immunitaire (**Hussain et coll., 2008**). La libération des particules par la Vpu par l'intermédiaire d'un canal ionique correspond à sa partie transmembranaire (**Schubert et coll., 1996**). La protéine Vpu est antagoniste à celle appelée BST-2 (tetherin), qui a la capacité de retenir les particules à la surface des cellules (**Mitchell et coll., 2009**). En effet Vpu diminue légèrement le taux de BST-2 à la surface des cellules par l'intermédiaire d'une ligase. Cette suppression de BST-2 par la Vpu nécessite l'interaction d'une protéine cellulaire, β -TrCP (**Margottin et coll., 1998**).

II.2.4.4. Le gène *nef* (negative expression factor)

La protéine Nef de 25 à 35 kD est codée par un cadre de lecture correspondant au gène *nef* et entre en chevauchement avec la partie 3'LTR du génome du VIH-1, VIH-2 et des SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Cette protéine est synthétisée durant la première phase de la réPLICATION virale car essentielle à la progression de la maladie (**Kestler et coll., 1991**). La protéine est constituée d'une partie N-terminale suivie d'une section sous forme d'hélice et riche en proline et enfin une région, la C-terminale qui est une boucle flexible et nécessaire à la plupart des fonctions de la protéine (**Geyer et coll., 2001**). Nef se retrouve essentiellement dans la membrane plasmique des cellules infectées. Cependant, elle est aussi retrouvée dans le cytoplasme, la membrane nucléaire et dans le noyau (**Ranki et coll., 1994**). Cette diverse localisation de la protéine Nef dans la cellule est probablement liée à ses trois fonctions principales que sont :

- une régulation négative du taux de CD4 à la surface des cellules et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (**Greenway et coll., 2000**). Cette régulation n'a pas d'impact sur la réponse immunitaire. Cependant, comme les CD4 sont les récepteurs spécifiques du VIH, cette régulation aura un impact sur l'infectiosité et la réPLICATION virale (**Landi et coll., 2011**). Cette régulation du taux de CD4+ requiert un motif spécifique de trois acides aminés Valine-Glycine-Phénylalanine (VGF) dans la partie N-terminale de la protéine Nef et toute mutation au niveau de ce motif interfère avec les fonctions de la protéine, plus particulièrement chez les VIH-1, groupe O (**Meuwissen et coll., 2012**),

- la modulation des voies de signalisation cellulaire au niveau des lymphocytes CD4 et des macrophages (**Greenway et coll., 2000**). La région N-terminale de Nef, au niveau des résidus 1-57 contient un site de fixation à la protéine p53 pour inhiber la fonction de cette dernière dans un processus induisant l'apoptose (**Greenway et coll., 2002**). Nef interagit avec les endosomes AP-1 et AP-2, modifiant ainsi leur morphologie et leur distribution. Nef réduit également le taux de recyclage de la transferrine (TfR) au niveau de la membrane plasmique, occasionnant son accumulation au niveau des endosomes et diminuant ainsi leur expression à la surface cellulaire (**Madrid et coll., 2005**),
- une possibilité d'augmenter l'infectiosité du virus (**Greenway et coll., 2000**). La protéine Nef a une action négative sur le taux d'expression des HLA (Human leukocyte Antigen) A et B mais n'affecte pas les HLA-C et E (**Cohen et coll., 1999**). Cette action de Nef sur les HLA protège les cellules de l'hôte contre la toxicité des NK (Natural Killer) à défaut de celles qui expriment les HLA-C et E. En outre, Nef a la capacité d'inhiber, l'expression à la surface des cellules, de molécules activatrices qui peuvent déclencher la fonction cytotoxique des NK (**Fausther-Bovendo et coll., 2009**). La protéine Nef aussi, interagit avec la Vpu pour éviter l'action des cellules NK par une diminution du taux de NTB-A à la surface des cellules infectées (**Shah et coll., 2010**). Il a été aussi démontré que la protéine Nef favorise la transmission du VIH-1 aux CD4+ à travers les cellules dendritiques et la prolifération des CD4+, ce qui peut contribuer à la pathogénèse de l'infection virale (**St. Gelais et coll., 2012**).

II.3. Cycle de réPLICATION du VIH-1

La production de particules virales infectieuses implique de nombreuses interactions entre les protéines virales et cellulaires à chaque étape du cycle de la réPLICATION du VIH-1 (**Bauby et coll., 2008**). L'ensemble de ces étapes peut être subdivisé en deux phases essentielles : une phase précoce et une phase tardive, conférer figure 22 ci-dessous (**Turner et Summers, 1999**).

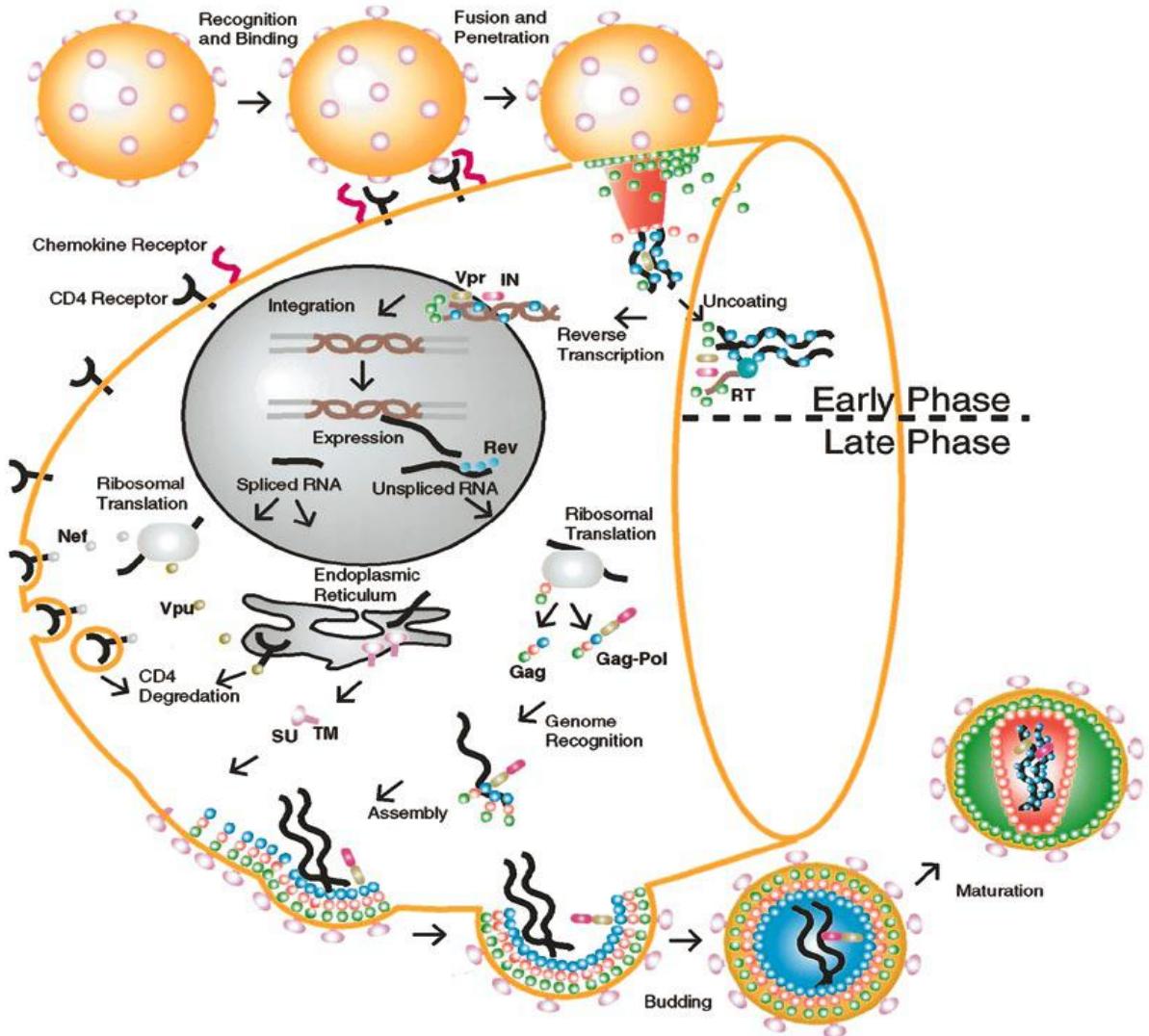


Figure 22 : Cycle de réplication du VIH-1 (Turner et Summers, 1999)

II.3.1. La phase précoce

Elle commence depuis l'attachement du virus sur son récepteur spécifique jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Turner et Summers, 1999).

II.3.1.1. Fusion et entrée de l'ARN viral

La première étape de la réplication virale est la fixation de la particule virale à la surface de sa cellule cible (Sharma et coll., 2000). Le mécanisme utilisé par le VIH pour entrer dans la cellule cible est un processus séquentiel qui fait intervenir trois grandes étapes : l'interaction gp120/CD4, la liaison de la gp120 aux corécepteurs CCR5 et CXCR4 et enfin, l'activation des propriétés fusogènes de gp41 qui permet la fusion des membranes virales et cellulaires, conférer figure 23 (Doms et Peiper, 1997).

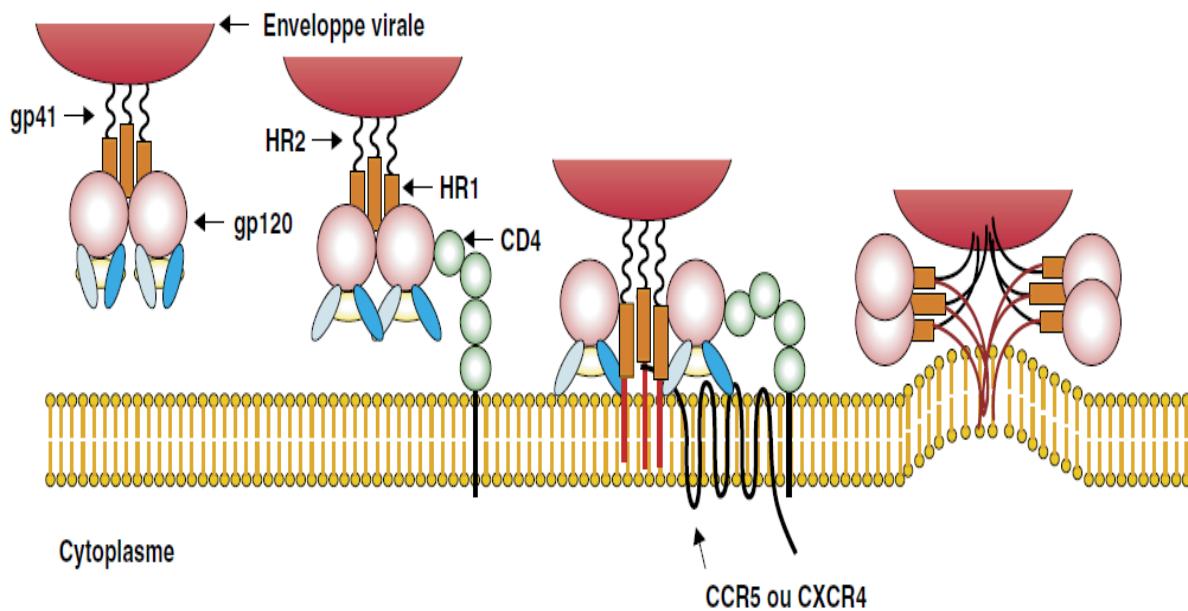


Figure 23 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible (Doms et Peiper, 1997)

Tout d'abord, le dimère gp41/gp120 du virus reconnaît son récepteur spécifique, le CD4. L'interaction entre CD4 et gp120, entraîne un changement de conformation à la fois sur le CD4 et le gp120, plus l'intervention des corécepteurs de la famille des chimiokines à savoir le CCR5 chez les macrophages et le CXCR4 chez les lymphocytes T CD4 (**Berger et coll., 1999**). Pour les changements de la gp120, nous avons un déplacement des boucles V1/V2 pour faire apparaître le site de liaison du corécepteur CCR5 ou CXCR4. Ce changement de conformation au niveau de la boucle V1/V2 est à l'origine d'une augmentation du degré d'affinité au niveau des liaisons, induisant le CCR5 comme corécepteur (**Kolchinsky et coll., 2001**). Une seconde interaction entre gp120 et les corécepteurs, entraîne d'autres changements de conformation au niveau des glycoprotéines d'enveloppe (**Kwong et coll., 1998**). Ces modifications de conformation sont à l'origine de la dissociation entre gp41 et gp120, ensuite la fusion des membranes cellulaire et virale et enfin, la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule (**Moore et Doms, 2003**). La fusion membranaire est sous la dépendance du FP, peptide de fusion qui va s'insérer dans la membrane cellulaire après la liaison de la gp120 avec les récepteurs, mais également d'un changement de conformation au niveau des régions HR1 et HR2 de la gp41 (**Chechley et coll., 2011**). La région HR2 se repositionne pour interagir avec la HR1 et former un faisceau de six hélices. Cette formation en faisceau entraîne le mélange des lipides des deux membranes et conduit à la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule (**Pierson et Doms, 2003**). Le VIH utilise aussi les vésicules d'endocytose comme voie d'entrée dans les macrophages (**Maréchal et coll.,**

2001), mais également des structures particulières appelées synapses virologiques dans les contacts cellules à cellules, comme la transmission du VIH des cellules dendritiques aux lymphocytes T (**Piguet et Sattentau, 2004**).

Il a été aussi démontré que le VIH-1 utilise le GalCer (galactosyl ceramide) comme récepteurs spécifique pour infecter les cellules neuronales (**Harouse et coll., 1991**). Les VIH-1, VIH-2 et SIV sont reconnus par le fait d'utiliser une lectine de type C, le DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) à la surface des cellules dendritiques. Ces dernières permettent au virus d'échapper à la réponse immunitaire avant sa transmission aux lymphocytes T grâce à la fixation du DC-SIGN à la gp120 (**Geijtenbeek et coll., 2000**). Les DC-SIGN ne peuvent pas être considérés comme récepteurs spécifiques à l'instar des CD4 car ils n'entraînent pas une infection, raison pour laquelle, ils sont utilisés comme facteurs de fixation du virus aux cellules dendritiques (**Lue et coll., 2002**).

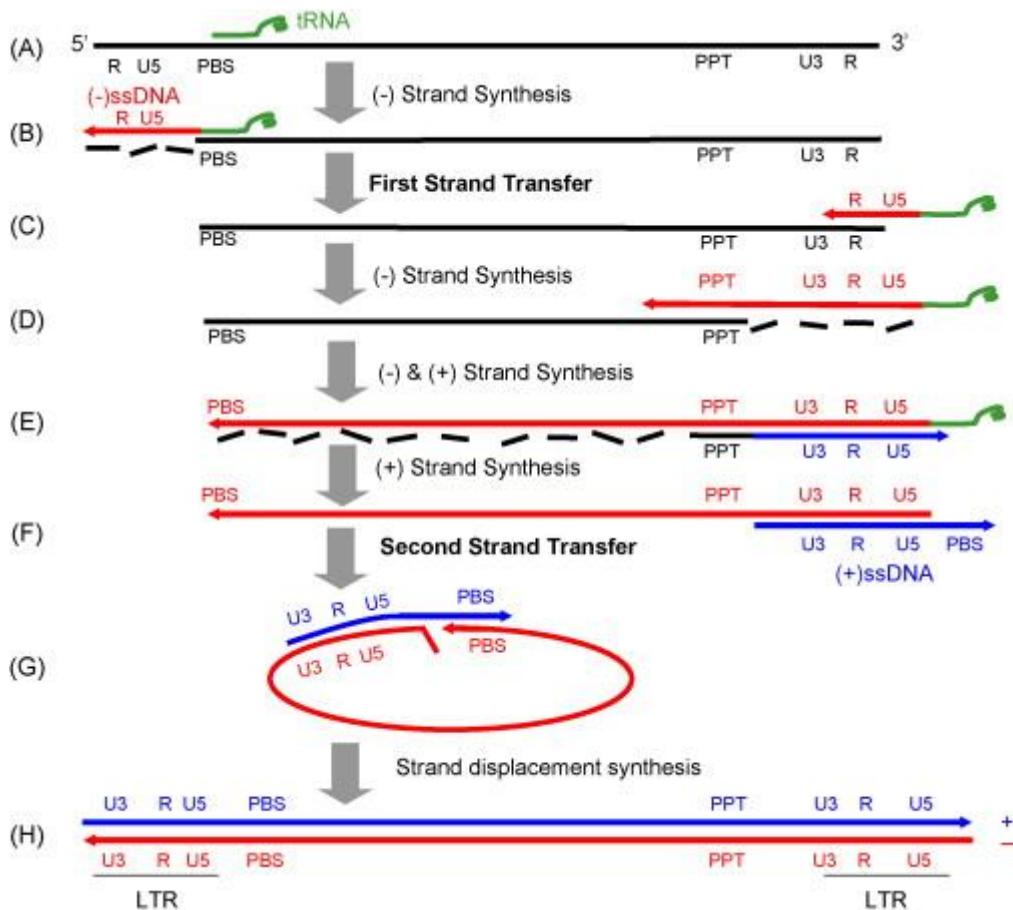
II.3.1.2. Décapsidation et transcription inverse

La fusion des membranes virales et cellulaires libère un complexe de rétrotranscription ou RTC dans le cytoplasme (**Fassati et Goff, 2001**). Plusieurs protéines virales, à savoir la capsid (CA), la matrice (MA), la protéase (PR), la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN) et la Vpr ont été signalées comme composantes du RTC (**Iordanskiy et coll., 2006**). La présence de la capsid dans le RTC permet de conserver la structure et de la protéger de la dégradation contre des facteurs cellulaires (**Warrilow et coll., 2008**). La transcription inverse a lieu après la libération du RTC de son nucléocapsid et dès lors, il se traduit en complexe de pré-intégration ou PIC (**Fassati et Goff, 2001**). Ce processus d'obtention du PIC au début de la transcription inverse est appelé : la décapsidation (**Zhang et coll., 2000**). Des facteurs cellulaires sont essentiels à la décapsidation à savoir : le pin1, le cyclophilin A (CypA) et le tRNA₃^{Lys} (**Friedrich et coll., 2011**).

Il a été démontré que la phosphorylation de la CA a un effet stimulateur du processus d'encapsidation. Le Pin1 est un facteur cellulaire qui, en se fixant sur la région phosphorylée de la CA, facilite ce processus de décapsidation (**Misumi et coll., 2010**). Le CypA initialement identifié comme une protéine cible des molécules immunosuppresseurs, a été connu comme facilitateur du processus de décapsidation (**Li et coll., 2009**). Le tRNA₃^{Lys} est utilisé comme amorce durant la réaction de rétrotranscription (**Leiman et coll., 2004**).

Après son entrée dans la cellule, l'ARN viral est converti en double brin d'ADN durant le processus de la rétrotranscription grâce à la transcriptase inverse, la RNase H et des nucléotides cellulaires. Cette réaction de rétrotranscription est entièrement achevée avant

l'import dans le noyau et son intégration dans la chromatine (**Arhel et coll., 2007**). La figure 24 ci-dessous montre les différentes étapes de la rétrotranscription. Elle est initiée par la synthèse du brin (-) d'ADN (en rouge) au site PBS (primer binding site) en 5', après la fixation de l'amorce tRNA₃^{Lys} (**Berkhout et coll., 2001**). La fixation de l'amorce tRNA₃^{Lys} et l'initiation de la rétrotranscription requièrent la présence de NCp7 (**Lapadat-Tapolsky et coll., 1995**). Cependant une interaction entre l'APOBEC3G et NCp7 peut inhiber la fixation tRNA₃^{Lys} et l'initiation de la transcription inverse (**Guo et coll., 2007**). La protéine Vif peut aussi remplacer NCp7 dans cette fonction (**Isel et coll., 2010**). Une nouvelle étude a aussi démontré que la transcriptase inverse a la possibilité de se fixer sur l'APOBEC3G entre les acides aminés 65-132 et atténuer son action inhibitrice dans la réaction de rétrotranscription (**Wang et coll., 2012**). Après déplacement de brin, ce fragment d'ADN s'associe alors par complémentarité de la région R (Repeated) à l'extrémité 3' du génome. La synthèse complète du brin (-) d'ADN s'accompagne de la dégradation progressive de l'ARN matrice par la RNase H (**Berkhout et coll., 2001**). La synthèse du brin (+) d'ADN (en bleu) est initiée au site PPT (polypurine tract) en 3' du génome. Chez les *lentivirus*, l'initiation s'effectue aussi à un site PPT central. Après un second transfert de brin, la synthèse du brin (+) se poursuit pour générer le double brin d'ADN final (**Basu et coll., 2008**).



A : Synthèse d'ADN à partir de l'amorce tRNA₃^{Lys},

B : Dégradation de l'ARN (noir) par la RNase H,

C : Transfert de brin vers l'extrémité 3',

D : Synthèse du brin d'ADN- (rouge) et dégradation de l'ARN matrice par la RNase H,

E : Utilisation du site PPT comme amorce pour la synthèse de l'ADN+ (bleu),

F : Dégradation du tRNA₃^{Lys} par la RNase H,

G : Appariement des bases à partir du site PBS entre les deux brins d'ADN synthétisés,

H : Synthèse complète de l'ADN double brin avec des LTR aux extrémités.

Figure 24 : Les différentes étapes de la rétrotranscription (Basu et coll., 2008)

II.3.1.3. Intégration de l'ADN viral

Le complexe de pré-intégration (PIC) ainsi formé devra être transporté depuis le cytoplasme vers le noyau avant d'être intégré dans le chromosome cellulaire (**Suzuki et Craigie, 2007**). L'enzyme spécifique qui catalyse ce processus d'intégration est l'intégrase (**Vink et coll., 1993**) et sa présence est essentielle au maintien de la structure du PIC et son transport dans le noyau (**Dobard et coll., 2007**). Les différentes étapes de l'activité enzymatique de l'intégrase dans le processus d'intégration ont été développées dans le chapitre II.2.2.2 et représentées

par la figure 12. La Protéine Rev pourrait intervenir dans l'intégration de l'ADN proviral en contrôlant l'activité de l'intégrase (**Rosenbluh et coll., 2007**).

Ce PIC inclut aussi des protéines cellulaires, à savoir : BAF, HRP-2 et LEDGF/p75, qui jouent un rôle essentiel dans le déplacement des grosses molécules vers le noyau (**Al-Mawsawi et Neamati, 2007**). Ce transport actif est assuré par le cytosquelette de la cellule, qui comporte des filaments d'actine et des microtubules (**Nathalie et Charneau, 2009**). Des nucléoporines et importines qui se déplacent entre la face cytoplasmique de la membrane nucléaire et le nucléoplasme ont été identifiées comme composants dans l'import nucléaire (**Ebina et coll., 2004**).

Le BAF pour Barrier-to-Autointegration Factor est intégré au PIC et peut empêcher l'auto intégration de l'ADNc avant l'intégration proprement dite (**Lee et Craigie, 1998**) et participe aussi à l'orientation du PIC vers la chromatine (**Shun et coll., 2007**). Le HRP-2 (Hepatoma-derived growth factor related protein 2), a un effet favorisant sur l'activité de l'intégrase (**Vandegraaff et coll., 2006**). La protéine LEDGF/p75 agit comme protectrice de la dégradation protéasomique de l'intégrase (**Llano et coll., 2004**) et comme facteur essentiel dans l'intégration de l'ADN proviral grâce à son interaction avec l'intégrase (**Krishnan et Engelman, 2012**). Cependant, la protéine Rev entre en compétition avec l'intégrase au niveau du même site de fixation sur la protéine LEDGF/p75. Cela détermine ainsi un ménage à trois qui régule la fréquence d'intégration de l'ADN proviral pendant la réplication. L'association de Rev avec la protéine LEDGF/p75 à la place de l'intégrase va limiter l'intégration de l'ADN d'un nouveau virus dans le cas des surinfections (**Greve et Uberla, 2010**). Un autre composant du PIC, non pas une protéine cette fois-ci, est un résidu d'ADN inhabituel dénommé DNA flap, résultant de la transcription inverse et présent dans l'ADN viral des *lentivirus* (**Zennou et coll., 2000**). Il a été démontré que les ADNc dépourvu de DNA flap s'accumulent à la périphérie du noyau alors que d'autres le comprenant, entrent facilement dans le noyau (**Van Maele et coll., 2003**). A coté de ces facteurs et protéines à effet favorisant dans le processus d'intégration, il existe des protéines, à savoir le RAD51 et KAP1 ou TIF, qui ont un effet négatif sur ce processus d'intégration (**Suzuki et coll., 2012**). Le RAD1 peut empêcher l'intégration par des interactions physiques avec l'intégrase (**Desfarges et coll., 2006 ; Cosnefroy et coll., 2012**). Le KAP1 ou TIF (transcription intermediary factor), en se complexant avec le HDAC (histone deacetylase) réduit l'efficience de l'intégration et ceci parce que le traitement des particules virales au HDAC améliore leur capacité d'intégration (**Allouch et coll., 2011**).

II.3.2. La phase tardive

La phase tardive du cycle de la multiplication du VIH-1 correspond à la transcription, l’assemblage, le bourgeonnement, la maturation et à la libération de virus infectieux dans le milieu extracellulaire (**Bauby et coll., 2008**).

II.3.2.1. Transcription de l’ADN viral en ANRm

Après l’intégration, le provirus intégré du VIH-1 peut rester latent ou alors démarrer une transcription active en se comportant comme un gène cellulaire. La transcription du provirus se fait grâce à l’ARNpol II cellulaire et est en grande partie régie par les facteurs de transcription cellulaires. Les sites de régulation des LTR permettent l’initiation de cette transcription, mais la protéine Tat joue un rôle primordial (**Turner et Summers, 1999**). L’interaction entre Tat, l’élément TAR et le cofacteur P-TEFb entraîne une hyperphosphorylation au niveau de la région C-terminale de l’ARN polymérase II, favorisant ainsi son activité dans le cycle viral (**Parada et Roeder, 1996**). L’ARN polymérase II cellulaire est généralement activée suite à une interaction entre la protéine Tat, un motif particulier au niveau de l’élément TAR et différents facteurs cellulaires dont le NFkB (**Brady et Kashanchi, 2005**). Cependant, l’activation de la transcription peut également se faire par la suite d’une liaison directe entre Tat et les protéines cellulaires (**Vardabasso et coll., 2008**).

Malgré la petite taille de son génome, plus de 30 différentes espèces d’ARN ont été identifiées et subdivisées en trois catégories principales : ARN génomique (environ 9 kb), ARNm mono-épissé (environ 4 kb) et des ARNm multi-épissés (environ 2,2 kb). L’ARN génomique code pour les précurseurs Gag et Gag-Pol, les ARNm mono-épissés codent pour le précurseur Env et pour les protéines Vpu, Vif et Vpr et les ARNm multi-épissés codent pour les protéines Tat, Rev et Nef. La transcription aboutit à la production de transcrits primaires, équivalents aux messagers précoces qui vont donner les protéines de régulation Tat et Rev. Ces dernières, retournant dans le noyau, vont amplifier la production des différents messagers vitaux, de l’ARN génomique et favoriser l’expression des protéines dites tardives Gag, Pol, Vif, Vpr, Env et Nef (**Freed, 2001**).

II.3.2.2. Assemblage des particules virales

L’assemblage des particules virales dépend principalement du précurseur polyprotéique Pr55^{gag}. Il a été démontré que, seule l’expression du gène *gag* est suffisante pour permettre la production de pseudo-particules virales en l’absence des glycoprotéines d’enveloppe, de la TI,

de la protéase et de l'ARN génomique (**Boulanger et Jones, 1996**). Ce précurseur Pr55^{gag} contient donc, en dehors des autres composants viraux, toute l'information nécessaire à la formation des particules virales. Il constitue ainsi la véritable clé de voûte de la particule virale, permettant l'incorporation de tous les composants indispensables et participant à l'élaboration de particules virales infectieuses, à savoir : les glycoprotéines d'enveloppe, l'ARN génomique et les protéines auxiliaires (Vif, Vpr et nef) (**Wills et Craven, 1991**). Cette capacité d'assemblage du Pr55^{gag} est liée à ses propriétés intrinsèques avec différents domaines fonctionnels :

- un domaine M (membrane binding domain), contenant les 32 premiers acides aminés et correspondant à la zone MA, permet l'adressage sous la membrane des précurseurs Pr55^{gag},
- un domaine I (Interaction domain), compris dans NC, qui interagit avec l'ARN viral et catalyse la réaction d'assemblage,
- un domaine L (late domain), contenu dans la région p6, est impliqué dans la taille des particules virales mais aussi et surtout dans le processus de détachement de la particule virale bourgeonnante de la membrane plasmique (**Garnier et coll., 1998**).

Ces domaines M, I et L agissent en synergie pour permettre l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale. Cependant, la région essentiellement impliquée dans le transport a été localisée au niveau du domaine M (**Kräusslich et Welker, 1996**). La région MA intervient également dans le transport lors de l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe (**Boulanger et Jones, 1996**).

L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe semble être un mécanisme sélectif faisant intervenir des interactions spécifiques entre le gp41 et le domaine MA (**Garnier et coll., 1998**). Cependant, malgré cette spécificité relative d'interactions entre le Pr55^{gag} et les glycoprotéines d'enveloppe, le domaine MA peut se lier de façon non covalente à la gp41, permettant ainsi l'incorporation au sein de la particule virale, d'éléments responsables du tropisme cellulaire (**Chazal et coll., 2001**). Un cofacteur cellulaire, TIP47 (tail-interacting protein) a été identifié et joue un rôle de connecteur entre le précurseur Gag et les glycoprotéines d'enveloppe, permettant ainsi l'incorporation de ces dernières lors de l'assemblage des particules virales (**Bauby et coll., 2008**). L'incorporation de ces glycoprotéines d'enveloppe met en jeu deux modes différents :

- une incorporation passive, n'impliquant aucune interaction entre les protéines Gag et Env

- et une incorporation régulée de deux manières : d'une part, par des interactions directes entre la région MA de Gag et le domaine CT de Env et d'autre part, par des interactions indirectes grâce à une protéine de liaison, la TIP47 (**Checkley et coll., 2011 ; Murakami, 2012**).

Lors de l'assemblage, le précurseur Pr55^{gag} se lie à l'ARN viral et permet son encapsidation dans le virion. Cette étape semble être le véritable catalyseur de la morphogénèse de la particule virale et nécessite une interaction entre les protéines virales et l'ARN génomique, mettant en jeu des régions spécifiques du précurseur et des séquences de sélection localisées sur l'ARN génomique. Il a été ainsi démontré que la région impliquée dans la reconnaissance de l'ARN génomique, dans sa dimérisation et dans son encapsidation, est localisée au niveau de NC (**Cimarelli et Darlix, 2002**). Toutefois, il est probable que d'autres signaux secondaires soient nécessaires à l'encapsidation (**Russell et coll., 2004**). La région NC et celle de la TI contenue dans le précurseur Pr160^{Gagpol} semblent être responsables de l'hybridation et l'incorporation de l'ARNT^{Lys3}, qui est un élément indispensable dans la formation de virions (**Kleiman, 2002**).

Au cours des différentes étapes de la réaction d'assemblage, de multiples partenaires viraux et cellulaires ont été identifiés et parmi eux :

- la protéine Vif, elle est incorporée grâce à des interactions entre son domaine C-terminal et la partie N-terminale de la p6 du précurseur Pr55^{Gag} (**Steffens et Hope, 2001**),
- la protéine cellulaire HP68, qui facilite la conversion des intermédiaires d'assemblage en particules virales immunitaires (**Zimmerman et coll., 2002**),
- la protéine Nef, elle est aussi retrouvée dans le core de la particule virale suggérant une interaction avec la protéine Vif (**Arora et coll., 2002**),
- la cyclophiline A, protéine ubiquitaire qui est localisée dans le noyau et est incorporée spécifiquement dans la particule virale naissante grâce à l'interaction avec le domaine riche en proline de la région CA du Pr55^{Gag} (**Luban et coll., 1993**).

Les précurseurs Gag et Gag-Pol se retrouvent au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée pour former des virions immatures d'environ 120 nm de diamètre grâce au degré d'affinité des différentes protéines qui la composent (**Lee et coll., 2012**).

II.3.2.3. Bourgeonnement et maturation de particules virales

Lorsque l'ensemble des éléments nécessaires à la constitution de la particule virale est réuni et que la réaction d'assemblage amorcée, l'étape du bourgeonnement commence. Cette étape

correspond au moment précis où la particule virale complètement formée va se détacher de la cellule (**Chazal, 2005**). Il a été démontré que, la séparation du virus de la cellule requiert une interaction avec le domaine L de la p6 du Pr55^{Gag} (**Freed, 2002**). Bien que ce processus de bourgeonnement soit initié par la protéine Gag, il est accompli par la famille des ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) (**Carlson et coll., 2008**), grâce à des interactions avec la protéine p6 (**Usami et coll., 2009**). Chaque virus immature contient approximativement 120 molécules Gag-Pol et 2400 monomères de Gag (**Jacks, 1990**).

Cependant, pour que la particule virale devienne infectieuse, une étape de maturation par la protéase s'avère indispensable (**Freed, 1998**). La protéine Gag est capable d'empêcher l'activation précoce de la protéase durant l'assemblage et cette dernière n'est active qu'après une étape de dimérisation, une fois que les molécules de Gag aient fusionné avec la membrane plasmique (**Sundquist et Kräusslich, 2012**). Cette maturation se traduit par des changements morphologiques pour la formation de core (NC et ARN viral), de la capsidé (CA) et la libération des protéines virales de leurs précurseurs (**Ganser-Pornillos et coll., 2012**). En effet, en l'absence d'activité de la protéase, les particules virales obtenues présentent une morphologie anormale et une absence totale d'infectiosité (**Scarlata et Carter, 2003 ; Adamson, 2012**).

III. La diversité génétique

Une des caractéristiques majeures du VIH est sa grande variabilité génétique. C'est elle qui est responsable de la classification du virus en types, groupes, sous-types, sous-sous-types et formes recombinantes circulantes (**Ndung'u et Weiss, 2012**). L'un des facteurs le plus important pour la propagation des VIH dans le monde entier est sa grande diversité génétique (**Hamelaar, 2011**).

III.1. Origine de la diversité génétique

L'évolution extrêmement rapide du VIH est à l'origine d'un grand nombre de variants actuels (**Hamelaar, 2011**). En dehors des facteurs propres au virus lui-même, d'autres facteurs comme : la migration, les changements culturels et sociaux, le commerce et les réactions immunitaires peuvent influencer la répartition mondiale et la prévalence des souches de VIH dans le monde (**Kijak et McCutchan, 2005**). Cette grande variabilité génétique du VIH est essentiellement liée à un taux de réPLICATION très élevé, source de mutations aléatoires, combiné à la recombinaison génétique imputable à la transcriptase inverse (**Roberts et coll., 1988**).

III.1.1. Les mutations aléatoires

Le taux de mutations très important est lié à la faible fidélité de la transcriptase inverse, en moyenne une mutation ponctuelle par cycle infectieux (**Ho et coll., 1995**) et au fort taux de réPLICATION, allant jusqu'à plus de 10^{10} particules par jour (**Mansk et Temin, 1995** ; **Bakhanashvili et coll., 2005**). La transcriptase inverse est cependant, le principal facteur générateur de variabilité du génome viral du fait de l'absence d'activité 3'-5' exonucléasique (**Roberts et coll., 1988**), mais aussi par l'intermédiaire de mutagènes, facteurs cellulaires comme l'APOBEC3G (**Zhang et coll., 2003**). Les erreurs sont ainsi fréquentes et sont estimées à une, tous les 10000 nucléotides produits. Les estimations suggèrent près d'une mutation pour tous les trois génomes produits (**Abram et coll., 2010**). C'est surtout lors de la rétrotranscription de l'ARN en ADN que surviennent ces erreurs. Elles concernent le plus souvent la transition (substitution entre deux bases puriques ou deux bases pyrimidiques), la transversion (substitution entre bases puriques et pyrimidiques) et les sauts (-1) du cadre dans les suites de A et de T de même que l'hyper-mutabilité G–A (**Vartanian et coll., 1991**). Ces mutations ont été globalement classées en deux groupes, à savoir, les mutations synonymes et les non synonymes. Une mutation synonyme (conservation de l'acide aminé) est en général considérée comme une position qui n'est pas soumise à une pression de sélection, liée à la présence des molécules antirétrovirales (**Kijak et McCutchan, 2005**). Une mutation non synonyme (changement de l'acide aminé) peut avoir un effet immédiat positif (résistance aux antirétroviraux, échappement à la réponse immune) ou négatif (mutation létale) (**Brown et Holmes, 1994**).

III.1.2. La recombinaison génétique

En plus des erreurs de la transcriptase inverse, nous avons aussi les phénomènes de recombinaison (**Saag et coll., 1988**). Par conséquent, les isolats de VIH représentent une population de virus liés génétiquement mais avec des différences génomiques, c'est ce qui détermine la notion de «quasi espèce» dont les phénotypes biologiques peuvent varier (**Steinhauer and Holland, 1986**).

La recombinaison joue un rôle majeur dans l'évolution des rétrovirus et avec sa fréquence élevée, elle est considérée comme partie intégrante du cycle infectieux du VIH (**Simon-Lorière et coll., 2006**). L'étendue de la variation produite par recombinaison dépend du degré de similitudes entre les deux particules virales dans la première infection (**Kijak et**

McCutchan, 2005). Elle peut se produire dans les deux semaines qui suivent l'infection (**Wooley et coll., 1997**) et le VIH subirait 2 à 3 événements de recombinaison par génome et par cycle de réPLICATION (**Jetzt et coll., 2000**). Ce phénomène de recombinaison peut intéresser des virus d'un même sous-type (recombinaison intra sous-type), mais elle est plus évidente quant elle se produit entre sous-types différents (recombinaison inter sous-types). Le génome des rétrovirus est constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive, présente en deux copies dans chaque particule virale. Pour qu'une recombinaison génétique ait lieu, les deux copies de l'ARN génomique, présentes dans la capsid doivent être génétiquement différentes (**Clavel et coll., 1989**). Une infection cellulaire résulte de l'introduction du génome virale, composé de deux copies de l'ARN, dans le cytoplasme de la cellule. Une réaction de rétrotranscription permet à la transcriptase inverse (TI) de convertir l'ARN génomique en sa copie d'ADN double brin. La recombinaison est la conséquence de la génération, pendant la transcription inverse, d'un ADN chimérique portant une partie de l'information génétique de chacun des deux ARN génomiques. La formation de molécules chimériques pourrait avoir lieu, soit lors de la synthèse du premier brin d'ADN (le brin de polarité négative, brin -), soit lors de celle du second brin d'ADN (brin d'ADN de polarité positive, brin +), par différents mécanismes. Pour que deux ARN génétiquement distincts soit présents dans la même particule virale, certaines conditions doivent être remplies, conférer figure 25. Tout d'abord, 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). La co-infection est la survenue de deux infections chez une personne pendant la période de séroconversion due par la première infection et la surinfection se produit quand la nouvelle infection a eu lieu après le séroconversion due à la première (**Van der Kuyl et Cornelissen, 2007**). L'intervalle de temps entre la première et la deuxième infection peut varier de 3 à 32 mois (**Smith et coll., 2005**). Ensuite, au niveau de l'assemblage des particules virales, les différents ARN génomiques doivent être capables de former un dimère fonctionnel reconnu par la machinerie d'assemblage. Enfin, un dernier point concerne le fait que, lorsque deux provirus sont présents dans la même cellule, il est probable que des protéines structurales des deux virus puissent être recrutées pour l'assemblage des mêmes particules chimériques. Cela pourrait conduire en principe à des interférences entre ces protéines durant l'assemblage. Pour qu'une recombinaison ait lieu, il est en effet nécessaire que les virions hétérozygotes de ce pro-génie viral soient fonctionnels (**Simon-Lorière et coll., 2006**).

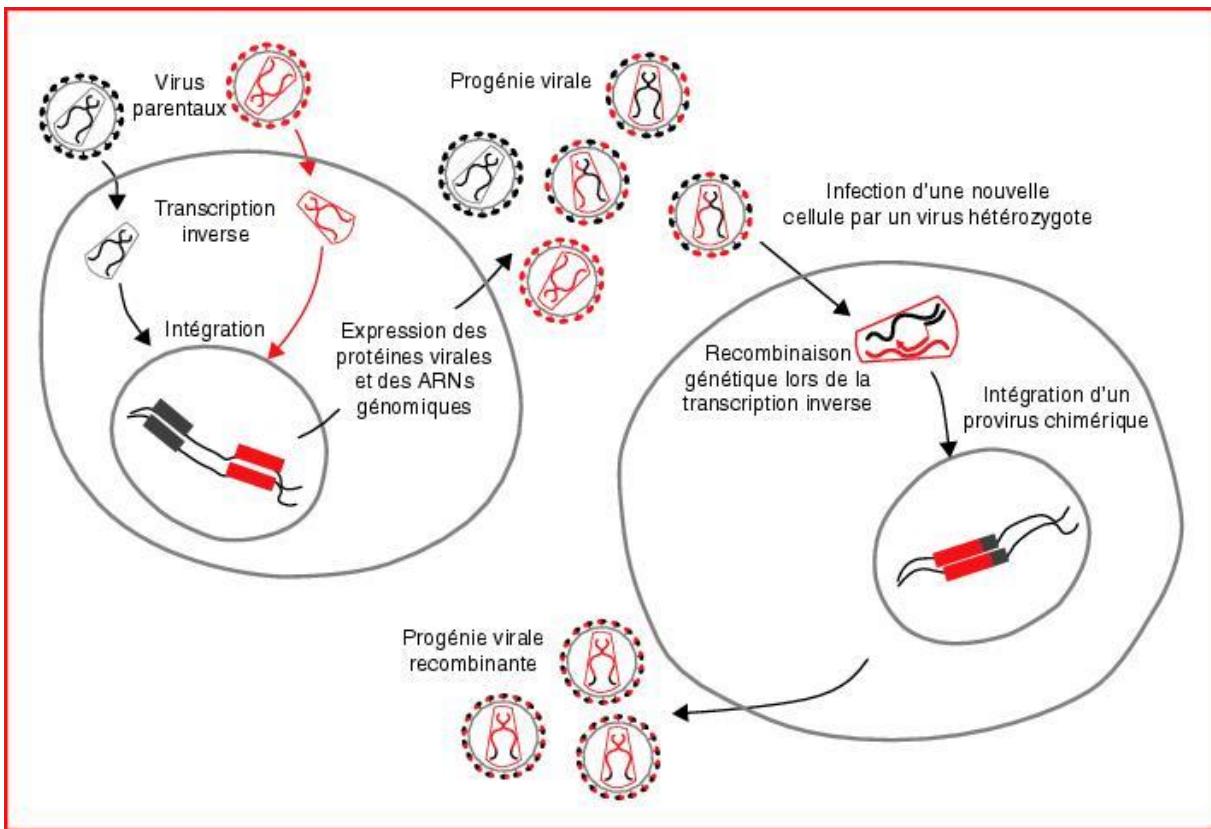


Figure 25 : Processus de recombinaison (Simon-Lorière et coll., 2006).

La surinfection est un phénomène le plus souvent rencontré dans un groupe de population dénommé, population clés, à savoir : les utilisateurs de drogue intraveineuse, les travailleuses du sexe et les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes (MSM, Men who have sex with men). La période de surinfection coïncide le plus souvent à un rebond de la charge virale et un déclin du taux de lymphocytes CD4 (**Blackard et Mayer, 2004**). Les conséquences de la recombinaison peuvent avoir un effet sur le tropisme cellulaire, la pathogénicité virale, la sensibilité aux médicaments antirétroviraux, la précision des tests courants du diagnostic sérologique et des tests de biologie moléculaire et la progression de la maladie (**Blackard et coll., 2002**). Les conséquences de la surinfection sont encore plus graves dans le cas des virus résistants, le résultat étant la formation d'un recombinant multi-résistant souvent associé à un double tropisme et une progression rapide vers la phase SIDA. Ce cas illustre l'impact des rapports sexuels non protégés chez les couples sérodifférents et séroconcordants (**Blick et coll., 2007**).

Le VIH, de par sa grande capacité réplicative, la présence de mutations et la fréquence des phénomènes de recombinaison mettant en jeu diverses variantes de VIH-1 chez les personnes infectées dans le monde entier, présente une circulation de variantes diverses d'une localité à une autre.

III.2. Epidémiologie moléculaire du VIH dans le monde

Le VIH-1 est responsable d'une pandémie globale alors que le VIH-2 n'est confiné qu'en Afrique de l'Ouest (**McCutchan, 2000**). L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 est un processus dynamique avec une distribution et des prévalences qui varient selon les localités. Cependant, le groupe M représente 98% des infections dans le monde (**Vidal et coll., 2000**) et le sous-type C est responsable d'environ 48% des infections mondiales (**Hemelaar et coll., 2011**). La recombinaison joue un rôle majeur dans l'épidémiologie mondiale du VIH bien que la prévalence des formes recombinantes varie considérablement selon les régions du globe. Les zones présentant une grande diversité de sous-types, telle que l'Afrique subsaharienne, ont un grand taux de recombinaisons en raison des phénomènes courants de co-infections et de surinfections avec deux ou plusieurs souches virales (**Li et coll., 1998**). En revanche, dans les zones comme l'Amérique du Nord où circule un nombre limité de sous-types, un faible taux de recombinants a été retrouvé (**Kijak et McCutchan, 2005**).

III.2.1. Les différents groupes et sous-types du VIH

Les VIH-1 est jusque-là classé en quatre groupes M, N, O et P (**Van Heuverswyn et coll., 2006 ; Plantier et coll., 2009**). Le groupe M du VIH-1 comprend neuf différents sous-types purs (A-D, F-H, J et K). La divergence des nucléotides entre les sous-types du VIH-1 est de 25-30% au niveau du gène *env* alors que dans le gène *pol*, partie la plus conservée chez les rétrovirus, elle est d'environ 9-11% (**Santos et coll., 2010**). Le sous-type A est subdivisé en sous-sous-types A1, A2 (**Gao et coll., 2001**) et plus récemment A3, A4, A5 et A6 (**Meloni et coll., 2004 ; Vidal et coll., 2006 ; Bártolo et coll., 2009 ; Vidal et coll., 2009**). Le sous-type F est lui-même subdivisé en sous-sous-types F1 et F2 (**Triques et coll., 1999**).

Le VIH-2 quant à lui, comprend neuf groupes (de A à I), mais seul les groupes A et B sont responsables de l'épidémie à VIH-2 et circulent principalement en Guinée Bissau et au Sénégal pour le groupe A et en Côte d'Ivoire pour le groupe B (**Damond et coll., 2004 ; Ayouba et coll., 2012**). Les autres groupes sont documentés individuellement. C'est le cas des groupes C, D, E et F isolés en Sierra Leone et au Libéria (**Santiago et coll., 2005**).

III.2.2. Les formes recombinantes circulantes

Les formes recombinantes circulantes ont été subdivisées en deux groupes : ceux qui sont retrouvés dans une population, avec au moins trois personnes sans lien épidémiologique présentant les mêmes points de recombinaison, sont appelés formes recombinantes circulantes

(CRF) et ceux qui ont été isolés chez moins de 3 individus sont appelés formes recombinantes uniques (URF).

Le premier cas de CRF identifié a concerné le sous-type E qui formait un cluster unique particulier dans l'analyse du gène *env*, alors que sur l'analyse du gène *gag*, il se regroupait dans le cluster du sous-type A. Ainsi, le "Sous-type E» était le résultat d'un événement de recombinaison entre le sous-type A d'une région *gag* et de la région *env* du sous-type E (**McCutchan et coll., 1996**). Ce virus a été rebaptisé CRF01_AE du nom des sous-types qui le composent et pour refléter sa nature de premier virus VIH-1 recombinant circulant identifié. Cependant, il aurait été suggéré que ce CRF01_AE ne soit pas une forme recombinante, mais plutôt un sous-sous-type du clade A dont la région *env* aurait muté plus rapidement que les régions *gag* ou *pol*. Des analyses de bootscanning et des statistiques sur des génomes de sous-type E en provenance de la Thaïlande et de l'Afrique Centrale, ont montré que les sous-types A et E sont monophylétiques. Cependant, s'ils sont associés, ils forment un groupe monophylétique. Le lien apparent sur différentes régions du génome est statistiquement faible pour parler de recombinaisons. Les relations évolutives des sous-types A et E sont comparables à celles qui existent entre les sous-types B et D, qui ne sont pas considérés comme un recombinant (**Anderson et coll., 2000**). C'est aussi le cas du sous-type I qui est en fait un recombinant complexe impliquant les sous-types A, G et I (**Nasioulas et coll., 1999**). Ce n'est qu'en 2001, que ce complexe nommé CRF04_cpx a été défini comme formé des sous-types A, G, H, K et U (Unknown) étant donné que le I a été enlevé de la nomenclature (**Paraskevis et coll., 2001**). Pour le VIH-1, à ce jour, 55 CRFs ont été caractérisés (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>, consulté le 05/07/2013) et le VIH-2, ne compte qu'un seul CRF décrit en Côte d'Ivoire et dénommé HIV2_CRF01_AB (**Ibe et coll., 2010**).

Par contre, les URFs ne constituent pas les grandes épidémies ; elles sont plutôt le sous-produit de brassage de multiples sous-types/CRF circulant dans une région donnée (**Janssens et coll., 1997**).

III.2.3. La répartition du VIH-1 dans le monde

La distribution mondiale du VIH-1 est très hétérogène avec une prévalence variable et des variants spécifiques en fonction des localités.

Le groupe M, représente 98% des infections dans le monde, figure 26, avec une grande diversité, son épicentre serait localisé en Afrique et plus particulièrement au Congo Kinshasa

(**Vidal et coll., 2000**). L'épidémie à VIH-1, groupe O est restreinte à la partie ouest de l'Afrique Centrale et sa prévalence est stable et peut être légèrement en baisse au Cameroun (**Ayoub et coll., 2001; Brennan et coll., 2008**). Des cas anecdotiques sont décrits dans des pays comme le Gabon (**Delaporte et coll., 1996**), le Sénégal et le Togo (**Peeters et coll., 1997**). Le VIH-1, groupe O est également trouvé dans des pays Européens comme la Belgique (**Peeters et coll., 1995**) et l'Allemagne (**Hampl et coll., 1995**). Le groupe N a été identifié en 1988 (**Simon et coll., 1998**). Il a été retrouvé principalement en Afrique de l'Ouest et du Centre (**Van Heuverswyn et coll., 2006**). Ce variant est originaire du Cameroun et avec une prévalence extrêmement faible qui est de 0,1% dans la population générale infectée (**Ayoub et coll., 2000**). Le groupe P a été décrit au Cameroun et à ce jour, seulement deux cas ont été identifiés, confirmant la circulation de ce variant qui pourrait exister à l'état latent au Cameroun (**Plantier et coll., 2009 ; Vallari et coll., 2011**).

Le VIH-1 sous-type B prédomine dans les pays du nord et il est responsable de l'épidémie initiale dans les pays industrialisés, en particulier l'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest, dont la France. Par contre à l'échelle mondiale, le VIH-1 non-B représente au moins 90% des virus circulants (**Geretti, 2006**). Les six autres sous-types du VIH-1 (D, F, G, H, J et K) sont relativement peu représentés avec seulement 10% des nouvelles infections en 2004 (**Hemelaar et coll., 2006**). La forme la plus répandue de VIH-1 est le sous-type C qui en 2011, a été responsable d'environ 48% des infections mondiales. Ensuite nous avons : 12%, sous-type A ; 11%, sous-type B ; 5%, sous-type E ; 2%, sous-type D et 22% pour les recombinants (**Hemelaar et coll., 2011**). Le sous-type D prédomine en Afrique de l'Est et le CRF02_AG en Afrique de l'Ouest. Le sous-type C est prévalent dans les pays de l'Afrique Australe où il représente les 2/3 des cas de VIH, dans les pays de l'Afrique de l'Est, dans la région sud du Brésil, en Inde (zone de forte densité de population) et dans les pays avoisinants. Le sous-type A est très répandu en Europe Centrale, en Afrique, en Iran et Europe de l'Est et en Asie Centrale. C'est le sous-sous-type A1 qui est la forme la plus répandue, alors que les sous-sous-types A2 et A3 se trouvent principalement en Afrique et rarement en Europe (**Peeters et coll., 2008**).

Concernant les CRFs, certains ont un grand impact sur les épidémies locales de VIH/SIDA, tels que le CRF01_AE en Asie du Sud et le CRF02_AG en Afrique de l'Ouest. Le CRF06_cpx est la deuxième forme recombinante circulante en Afrique de l'Ouest alors que les autres CRF ont une implication beaucoup plus faible (**Ramirez et coll., 2008**). C'est le cas du CRF03_AB en Russie, le CRF07_BC et CRF08_BC au chine, le CRF14_BG en Espagne

et le CRF15_01B au Thaïlande (**McCutchan, 2000**). Diverses recombinants, impliquant ces CRF ont été également décrits, bien qu'en de faibles proportions, en Afrique de l'Ouest ; c'est le cas du CRF02_AG/CRF06_cpx au Niger (**Mamadou et coll., 2003**) et du CRF02_AG/CRF09_cpx en Côte d'Ivoire (**Toni et coll., 2005**).

En définitive, l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 est un processus dynamique dans le temps. Pour exemple, le sous-type C qui ne serait entré au Brésil qu'au milieu des années 1980 (**Bello et coll., 2008**), représente 50% des nouvelles infections dans la région sud du Brésil et une prévalence qui augmente de 5 à 30% dans les pays voisins (**Locatelli et coll., 2007**). De même, dans la partie sud de l'Afrique, le sous-type C prédomine sur les autres sous-types (A et B) qui sont légèrement représentés (**Jacobs et coll., 2009**).

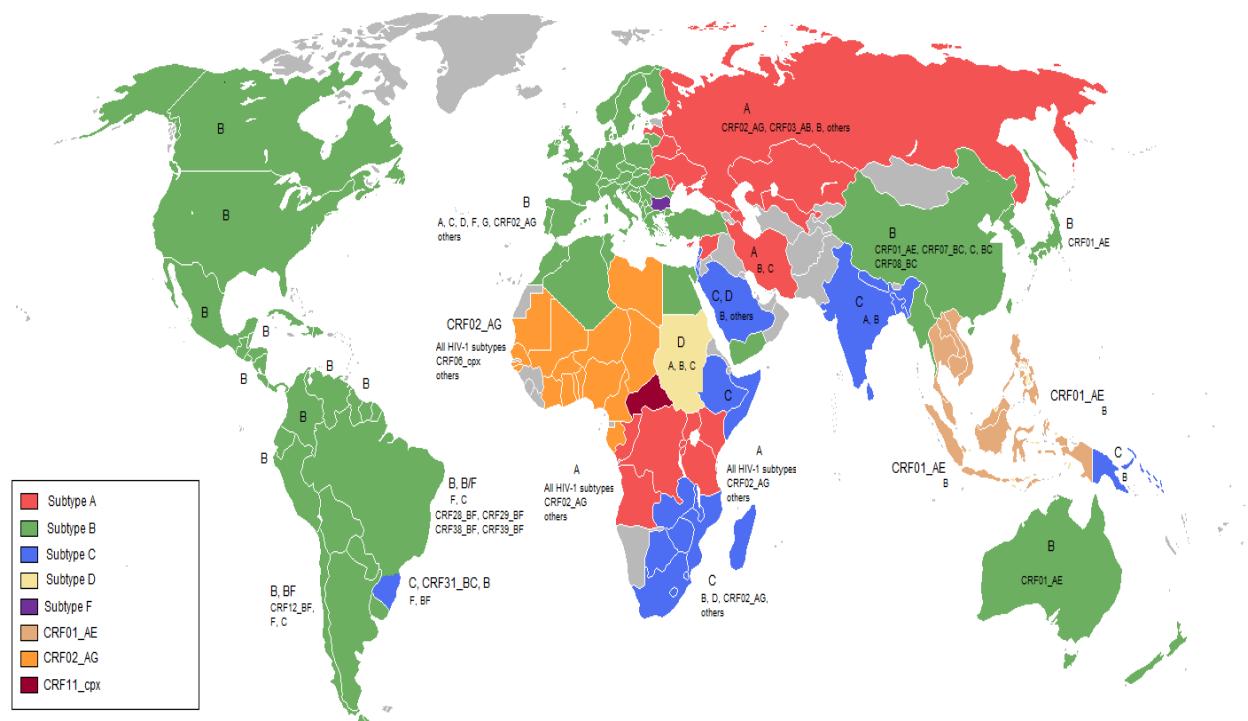


Figure 26 : Distribution géographique des sous-types et CRFs du VIH-1, groupe M (Santos et Soares, 2010).

La plus grande diversité est retrouvée en Afrique sub-saharienne avec des tendances géographiques variables d'une région à une autre. L'Afrique Centrale en particulier présente la plus grande diversité de souches, traduisant une infection plus ancienne. Tous les sous-types connus, de nombreux CRFs et une variété de recombinants uniques circulent dans cette zone (**Vidal et coll., 2000**). Beaucoup de sous-types et des souches non typées (unclassified) sont retrouvés dans cette localité (**Kita et coll., 2004**). Le CRF02_AG représenterait jusqu'à

60% des échantillons positifs au Cameroun et dans les pays avoisinants (**Montavon et coll., 2000**) à l'exclusion de la République Démocratique du Congo (RDC) où la diversité du VIH-1 dépasse celle de tous les autres pays combinés. En effet, comme le montre la figure 26, tous les sous-types, des CRFs comprenant les sous-types A, B, G, D, C, F, H, J, CRF01_AE ainsi que de nombreuses formes non identifiées, circulent dans toute la RDC (**Vidal et coll., 2000**). L'Afrique de l'Ouest présente un modèle épidémiologique similaire à celui de l'Afrique Centrale avec une prévalence du CRF02_AG allant de 37% au Nigeria, 66% au Ghana et jusqu'à 71% au Sénégal (**Peeters et coll., 2003**). Le CRF02_AG représente plus de 50% des souches qui circulent au Cameroun avec une mixture de sous-type G, CRF (CRF01_AE, CRF11_cpx et CRF13_cpx) et des URFs (**McCutchan, 2000**). Tous les sous-types du groupe M ont été documentés depuis 2000 au Sénégal avec 84,6% de sous-type A (**Toure-Kane et coll., 2000**). Une étude, menée en 2002, a montré une prédominance de CRF02_AG (**Laurent et coll., 2002**), plus de dix autres variants qui circulent, à savoir : C, B, D, G, A, A1, CRF06_cpx, CRF11_cpx, CRF45_cpx et plusieurs URFs (**Diop-Ndiaye et coll., 2010**). L'émergence du sous-type A3 a été notée en 2004 dans une cohorte des professionnelles du sexe (**Meloni et coll., 2004**). Cependant une étude menée chez les MSM montre une prévalence élevée du sous-type C qui s'élève à 40% dans cette population, suivi du CRF02_AG à 24,3%. (**Ndiaye et coll., 2009**). L'origine des sous-types C du Sénégal montre plusieurs introductions vers les années 1970 en provenance de l'Est et du Sud de l'Afrique (**Jung et coll., 2012**).

En Afrique de l'Est, l'épidémie est dominée par les sous-types C, D et le variant A1. Le sous-type C est particulièrement répandu dans la Corne de l'Afrique où il constitue les 90% des deux millions de cas de VIH en Ethiopie (**Kassu et coll., 2007**) et 73% des cas à Djibouti (**Maslin et coll., 2005**). Le sous-type A au Kenya, le C en Tanzanie (**McCutchan, 2000**) et le D en Ouganda (avec des prévalences allant de 40-70% selon les régions) où il co-circule avec le sous-type A et des recombinants A/D (**Collinson-Streng et coll., 2009**).

L'épidémie en Afrique Australe est largement dominée par le sous-type C, qui représentait plus de 90% des cas de VIH, suivi du sous-type B avec 7% des cas retrouvés essentiellement dans la communauté homosexuelle. Des études ont montré une évolution de cette diversité avec l'introduction des sous-types G (3,7%), CRF37_cpx (6,7%) et de formes recombinantes (7,7%) au Mozambique (**Bártolo et coll., 2009**) mais aussi d'autres sous-types tels que le sous-type A (3,1%) en Afrique du Sud (**Jacobs et coll., 2009**).

L'épidémie en Asie, largement dominée par les sous-types B, C et le CRF01-AE, a subi une importante évolution depuis les premiers cas de VIH décrits. En Chine, plusieurs recombinants B/C dont deux CRF ont été identifiés avec une distribution régionale, le CRF08_B/C et le CRF01_AE sont répandus dans le Sud et le CRF07_BC plus localisé dans le Nord (**Weniger et coll., 1994 ; Li et coll., 2010**).

En Inde, nous avons une prédominance du sous-type C suivi du sous-type B et du CRF08_BC (**Sahni et coll., 2002 ; Neogi, 2009**). Cependant, les sous-types A1, B, CRF01_AE et CRF06_cpx de même que des recombinants A/B et A/C ont également été identifiés (**Deshpande et coll., 2009**).

En Europe et en Russie, le sous-type B prédomine avec une prévalence atteignant 97%, mais l'immigration en provenance de régions endémiques non-B, a permis l'introduction d'autres souches de VIH. La proportion des souches non-B est en perpétuelle augmentation chez les MSM, allant de 11% en France, 13.5% en Italie, 23% au Royaume Unis, 24% en Espagne et à plus de 33% au Portugal (**Semaille et coll., 2008 ; Cuevas et coll., 2009**). Ce brassage entre sous-types a conduit à l'émergence du CRF14_BG (**Delgado et coll., 2002**). En France, plus de 25 à 50% des souches sont des non-B et plus particulièrement du CRF02_AG (**Descamps et coll., 2005 ; Peeters et coll., 2008**) et on constate également une augmentation de la fréquence de recombinaisons B/ CRF02_AG chez les MSM (**Leoz et coll., 2011**).

En république Tchèque, c'est le B qui est prévalent avec 76.6%. Il y a aussi un nombre croissant de sous-types non-B (A1, C, D, F1, G) et certaines formes recombinantes (CRF01_AE, CRF02_AG et CRF06_cpx) (**Linka et coll., 2008**).

En Amérique central et du Sud, ce sont les sous-types B et F ainsi que leurs recombinants qui prédominent avec un gradient Nord-Sud. Le sous-type B est responsable de 100% des cas à Mexico et au Bahamas, 80% des cas en Équateur et en Bolivie, 61-80% des infections au Brésil et 30% des cas colligés en Argentine (**Gomez-Carrillo et coll., 2006**). Au Brésil, la plupart des autres cas sont dus au sous-type F (**Veras et coll., 2007**), mais aussi les sous-types B, C et des recombinants. A Sao Paulo, les 90% des infections sont dues au sous-type B et 4% au sous-type F (**Sa Filho et coll., 2005**). La dynamique de l'épidémie est à l'origine de l'émergence d'une dizaine de recombinants circulants B/F et B/C avec une prévalence de 56,9 -70% des recombinants BF en Argentine (**Gomez-Carrillo et coll., 2006**). En Amérique du Nord, le sous-type B reste majoritaire avec plus de 95% des cas d'infection. La plupart des

cas de souches non-B, majoritairement du sous-type C est retrouvé dans les populations d'immigrants (**Akouamba et coll., 2005**).

En Australie et en Océanie, bien que le sous-type B reste majoritaire (74% des cas), d'autres sous-types liés à l'immigration, sont aujourd'hui décrits en des proportions non négligeables 12% de C, 9% de CRF01_AE et des cas limités de A et G (**Womack et coll., 2001**). Cette grande diversité et la distribution inégale des différents variants de VIH dans le monde auront certainement des conséquences sur les divers aspects de la prise en charge de l'infection à VIH.

III.3. Conséquences de la diversité génétique

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

III.3.1. Impact sur le diagnostic et le monitoring

La diversité du VIH-1 a un impact énorme sur le diagnostic et le monitoring virologique car, les tests sérologiques et les techniques de quantification de la charge virale ne sont pas toujours en mesure de détecter de la même manière tous les différents variants connus du VIH (**Lal et coll., 2005**). Il a été démontré que les tests ELISA et tests rapides ont des capacités de diagnostic variables entre les sous-types non-B (**Peeters et coll., 2003**) et surtout que les antigènes utilisés pour ces techniques étaient basés sur le sous-type B (**Louis et coll., 2008**). La performance de ces tests sérologiques de 4^{ème} génération peut être influencée par la grande diversité du VIH dans les pays Africains. Cependant, le diagnostic moléculaire par l'utilisation d'amorces génériques, permet de détecter l'infection de tous les sous-types et groupes du VIH-1 (**Yang et coll., 2000**).

La quantification de la charge virale est maintenant possible, aussi bien sur le plasma qu'à partir de spots de sang séchés (DBS, Dried Blood Spot) avec des trousse commerciales pour tous les sous-types du VIH-1. Mais les tests basés sur la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont montré des difficultés dans la quantification de l'ARN viral des VIH-1, groupe O (**Rouet et coll., 2010**). La technologie de Abbott real Time, TaqMan v.2 parvient à quantifier le VIH-1, groupe O et le Nuclisens EasyQ des laboratoires de Biomérieux arrive à quantifier le VIH-2, groupe A (**Rodés et coll., 2007 ; Sizmann et coll., 2010**). Cependant

jusqu'à ce jour, il n'y a pas de technique commerciale qui parvient à détecter les différents groupes du VIH-2. Le challenge repose alors sur la mise à disposition de nouvelles techniques de détection et de quantification (**Hemelaar, 2012**).

III.3.2. Impact sur la transmission et la progression de la maladie

Le VIH-2 comparé au VIH-1 montre : une phase asymptomatique plus longue, une charge virale faible, un déclin très ralenti du taux de CD4 et un faible taux de mortalité en faveur du VIH-2 (**Marlink et coll., 1994**). La diversité influe sur le niveau de transmission des sous-types de VIH-1 comparés entre eux. Il a été démontré que le sous-type C était plus transmissible comparé aux autres sous-types. Une étude a montré que cette différence peut être liée à une forte production du VIH-1 sous-type C au niveau vaginal comparé aux autres sous-types (**Hemelaar et coll., 2012**). Des études menées en Ouganda, Tanzanie et au Kenya ont montré que le sous-type D est responsable d'une progression vers la phase SIDA plus rapide, comparé au sous-type A (**Kaleebu et coll., 2002 ; Vasan et coll., 2006 ; Easterbrook et coll., 2010**). Cependant une étude menée en Tanzanie, montre que les sous-types A et C, ainsi que les recombinants sont plus transmissibles que le sous-type D durant la période pré-natale (**Renjifo et coll., 2001**).

La progression vers la phase SIDA est aussi influencée par le type de corécepteur et du tropisme cellulaire et il a été démontré que les souches qui utilisent les corécepteurs CCR5 des chimiokines sont plus transmissibles que celles utilisant le CXCR4 (**Berger et coll., 1999**). Chez les personnes infectées par le VIH-1, sous-type B, la forte utilisation du CXCR4 est associée à une progression rapide vers la phase SIDA comparé au sous-type C (**Tscherning-Casper et coll., 2000**). Ainsi, les souches dénommées «dualtropic», utilisant les deux corécepteurs ont une progression plus rapide vers la phase SIDA et c'est le cas du VIH-1, sous-type D (**Huang et coll., 2007**).

III.3.3. Impact sur la prise en charge thérapeutique

La diversité génétique constitue un véritable frein pour l'efficacité des molécules antirétrovirale. C'est la raison pour laquelle, la monothérapie instaurée depuis 1980 a été remplacée par la trithérapie à partir de 1996 et des bénéfices sur le plan clinique ont été notés (**Vella et coll., 2012**). Il a été établi que les souches de VIH-1 du groupe O et le VIH-2 sont naturellement résistantes aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (**Descamps et coll., 1997**). Plusieurs études menées en Afrique et en Asie ont montré qu'il

n'y a pas de différence de sensibilité entre les sous-types du groupe M, utilisant des schémas thérapeutiques diverses dont les molécules ont été synthétisées à partir du sous-type B (**Kantor, 2006**). En revanche, il y a des différences concernant les mutations de résistance entre les souches B et non-B. Toutes les 55 positions clefs de mutations de résistance pour les B ont été trouvées chez les non-B. Cependant, pour les 67 positions clefs de mutations de résistance pour les non-B, seulement 61 ont été retrouvées chez les VIH-1, sous-type B (**Kantor et coll., 2005**). Les souches non-B acquièrent très rapidement les mutations de résistance, comparées au sous-type B (**Kosakovsky et Smith, 2009**). Une caractérisation génétique de la protéase a montré la présence de mutations mineures chez les souches non-B. Ces mutations n'ont pas d'effet sur la sensibilité par rapport à une molécule antirétrovirale, mais associées, elles peuvent améliorer la réPLICATION virale et augmenter le niveau de la résistance une fois associées avec une ou plusieurs mutations majeures (**Vergne et coll., 2000**). Cette différence entre les souches B et non-B se manifestent aussi au niveau des mutations de polymorphisme pour la protéase, qui fait supposer la possibilité d'acquisition de mutations précoceS en faveur des non-B. Cependant, l'influence de ce polymorphisme sur le traitement antirétroviral n'a pas été démontrée sur le pln clinique (**Velazquez-Campoy et coll., 2002**)

III.3.4. Impact sur la recherche vaccinale

La diversité du VIH au niveau mondial en dehors des facteurs individuels, est l'un des véritables obstacles à la découverte d'un vaccin efficace contre le VIH. A cause de son évolution rapide et le développement de mutations chez chaque personne infectée, il est tout à fait difficile pour le système immunitaire des personnes infectées de maîtriser l'infection virale (**Hemelaar, 2012**). De ce fait, la découverte d'un vaccin efficace sera la solution durable contre la pandémie du VIH et des exemples d'études vaccinales à titre préventif ont été développés :

- L'étude dénommée RV144 qui consistait à l'administration d'un vecteur recombinant, «avipox» avec une protéine d'enveloppe, «aidsvax B/E» sur 16400 sujets Thaïlandais, a montré une réduction du risque d'infection à 31% (**Rerks-Ngarm et coll., 2009**),
- L'étude sur la prophylaxie près exposition, dénommée PrEP, a montré des résultats satisfaisants dans différents groupes et divers paramètres : le tenofovir utilisé comme gel vaginal entraînait une réduction à 39% de la transmission du VIH (**Karim et coll.,**

2011). Cependant, le tenofovir peut être utilisé par voie orale, seul ou associé avec de l'emtricitabine. Le tenofovir, utilisé seul, a entraîné chez des couples sérodifférents une réduction à 62% de la transmission du VIH-1, et associé avec l'emtricitabine, cette transmission est réduite à 44%, 63% et 73% respectivement chez un groupe d'hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes, un groupe d'hétérosexuel et des couples séroconcordants (**Ruffin et coll., 2012**).

Ces procédés cités ci-dessus, se basent sur la réponse à médiation cellulaire. Des études ont montré qu'en plus de cette médiation cellulaire, l'utilisation d'anticorps spécifiques serait un plus dans la découverte d'un vaccin efficace. C'est ainsi qu'une étude a mis en évidence des anticorps (VRC01 et VRC02), qui sont capables de neutraliser à 90% des souches de VIH-1 circulantes (**Wu et coll., 2010**). Un procédé de synthèse chimique a été aussi développé dans le but de mimer la fonction de liaison du CD4 à la gp120. La liaison de ce peptide à la gp120 peut diminuer l'infection de nouvelles cellules (**Baleux et coll., 2009**). Malgré ces importants résultats d'études vaccinales dans différents pays et sur des variants de VIH différents, l'évolution du virus pose toujours le problème d'un vaccin efficace. Le travail dans le cadre d'un réseau, incluant les différents pays africains à grande variabilité génétique du VIH pourrait améliorer les résultats de prévention et la couverture en termes de souches virale (**Gaschen et coll., 2002**).

III.4. Méthode de détermination des groupes et sous-types du VIH-1

La détermination des groupes et sous-types du VIH-1 est essentiellement basée sur deux techniques : la sérologie et les techniques moléculaires.

III.4.1. Détermination du génotype par sérotypage

Les tests sérologiques sont faciles à utiliser, peu onéreux et peuvent tester à la fois un grand nombre d'échantillons (**Peeters et coll., 2000**). De nombreuses techniques de sérotypage ont été mises en œuvre et sont le plus souvent utilisées dans le cas de large enquête épidémiologique. Nous pouvons citer les techniques immuno-enzymatiques (ELISA), utilisant des peptides synthétiques de la boucle V3 de l'enveloppe. Ces tests ont été utilisés avec succès pour diagnostic des infections dues au VIH-1, groupes M, N et O (**Mauclère et coll., 1997**). Cependant, ces tests ont des difficultés pour différencier les sous-types du groupe M (**Plantier et coll., 1999**) et le sérotypage est source d'erreurs dans l'identification des

génotypes, plus particulièrement dans les pays Africains, à grande variabilité génétique (**Nkengasong et coll., 1998**)

III.4.2. Détermination du génotype par des techniques moléculaires

Les techniques moléculaires sont essentiellement basées sur la méthode de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Le principe de base repose sur une amplification génique d'un ou de plusieurs gènes à partir de l'ADN proviral ou de l'ARN viral après une étape de rétrotranscription.

III.4.2.1. Séquençage et phylogénie moléculaire

Le séquençage est la méthode la plus précise et fiable pour identifier les variants du VIH-1. La méthode de séquençage la plus utilisée actuellement, est celle de Sanger réalisée avec des didéoxynucléotides ou terminateurs de chaîne (**Sanger et coll., 1977**). Après la PCR, les séquences obtenues (génome complet ou partiel) sont analysées par phylogénie pour déterminer leurs liens avec des séquences antérieurement caractérisées et disponibles dans les bases de données (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Plusieurs méthodes phylogénétiques sont utilisées pour l'analyse des séquences : la méthode du plus proche voisin (Neighbor Joining) et la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) et l'analyse des recombinaisons (Rip, Blast subtyping et le bootscanning (**Salminen et coll., 1995**).

La méthode du plus proche voisin est très rapide et permet d'obtenir de manière efficace un arbre correct. Elle compare de manière séquentielle les taxons deux à deux pour obtenir un arbre dont la longueur totale sera la plus courte possible (**Saragosti, 1997**).

La méthode du maximum de vraisemblance procure une estimation de la probabilité associée à chaque embranchement et la distance entre les nœuds. C'est une méthode un peu lente car associant les nucléotides et ne peut être utilisée que pour un nombre limité de taxons (**Saragosti, 1997**). L'arbre construit sera celui dont les embranchements positionnant les différentes séquences seront les plus probables (**Felsenstein, 1981**)

L'analyse de recombinaison est effectuée pour les branches dont les liaisons ne sont pas fiables. Cette fiabilité est appréciée grâce à une valeur statistique dénommée «bootstrap», qui traduit la fréquence d'obtenir le même embranchement. Cette valeur est estimée bonne lorsqu'elle est supérieure à 70%. Au cas contraire, la branche n'est pas considérée comme

fiable (**Sitnikova, 1996**), raison pour laquelle, il faudra faire des études de recombinaison en utilisant les différentes méthodes citées ci-dessus.

III.4.2.2. Multi-region Hybridization Assay (MHA)

C'est une technique qui permet de caractériser les sous-types, recombinants et les doubles infections par amplification de plusieurs régions du génome (**Hoelscher et coll., 2002**). La technologie utilise le principe de la PCR en temps réel avec des sondes spécifiques. Cette technique est largement utilisée dans les pays à grande variabilité génétique (**Vidal et coll., 2007**). Une étude récente a montré l'utilisation du MHA pour l'identification de huit variants communs entre l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Elle a aussi démontré la capacité de cette technique de mettre en évidence les doubles infections et par conséquent, elle peut être utilisée comme outil de surveillance de la variabilité génétique et le suivi des doubles infections dans les pays africains (**Vidal et coll., 2012**).

III.4.2.3. Single Genom Amplification (SGA)

Il a été démontré que les techniques de PCR et de séquençage classiques ne détectent que les variants majoritaires, supérieurs à 20% de la population virale chez un individu infecté (**Gunthard et coll., 1998**). Cependant, certains aspects de la recherche nécessitent la mise en place d'une nouvelle technique pour l'amplification des variants minoritaires (**Johnson et coll., 2008**). Le SGA initialement appelé SGS (Single Genom Sequencing) a été utilisé pour démontrer les limites des techniques de la PCR classique et de séquençage dans l'étude de la diversité génétique et la détection des mutations associées à la résistance aux antirétroviraux (ARV). Le principe est basé sur une cascade de dilution de la matrice de la réaction de PCR selon la loi de Poisson afin d'obtenir des produits de PCR à partir d'un seule copie, molécule unique (isolat). Le SGA permet de détecter 10% des mutations de résistance en plus de celles détectées par la technique de séquençage classique. Ces résultats montrent que le SGA, non seulement plus sensible que les autres techniques dans le suivi de la variabilité génétique, mais aussi plus adéquat dans la détection des mutations associées à la résistance aux ARV (**Palmer et coll., 2005**). Le SGA est aussi utilisé dans l'analyse moléculaire de la transmission du VIH-1 et son évolution dans les populations clés. Ces résultats qui ont été obtenus en appliquant le SGA sur le gène *env*, montrent aussi sa faisabilité sur d'autres gènes du génome viral en entier (**Salazar-Gonzalez et coll., 2008**). C'est ainsi que cette technique a été utilisée pour documenter les multiples infections et la présence de quasi-espèces dans une population infectée par le sous-type C. Cette étude prospective a montré une augmentation progressive

du nombre de quasi-espèces en utilisant les gènes accessoires et régulateurs que sont : *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* et *rev* (**Roszenkhan et coll., 2012**). Une autre étude effectuée sur 50 femmes de la Tanzanie a aussi montré l'importance du SGA dans l'étude de la distribution des sous-types, des infections multiples et la fréquence des recombinaisons. A partir de la région V1-C5 du gp120, 8% de recombinaisons inter sous-types incluant les sous-types C/A et D/A plus plusieurs complexes de recombinaisons ont été documentés. Cette fréquence des infections multiples et le taux de recombinaison contribuent de façon significative à la diversité génétique et ont un impact réel dans la conception de vaccin et le développement des stratégies thérapeutiques (**Kiwelu et coll., 2012**).

IV. Le traitement antirétroviral et la résistance du VIH-1 aux ARV

Depuis que le VIH-1 a été identifié comme virus responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise, plusieurs molécules pour le traitement antirétroviral (TARV) approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) ont vu le jour (**Mehellou et De Clercq, 2010**). L'objectif du traitement antirétroviral est de transformer l'infection virale, pouvant aboutir au SIDA, en une infection chronique par l'utilisation de différentes combinaisons thérapeutiques (**Tsibris et Hirsch, 2010**). En effet, depuis la création de la première molécule antirétrovirale dénommée la Zidovudine (AZT) en 1987, comme un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI), la palette des antirétroviraux n'a cessé de s'élargir. Le développement de molécules à cibles virales différentes, a permis d'obtenir des résultats très encourageants dans le cadre des associations thérapeutiques et d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients. L'année 1995 a marqué l'avènement des inhibiteurs de protéase (IP) (**Wensing et coll., 2010**) et en 1998, une nouvelle classe d'ARV a vu le jour avec les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) permettant ainsi l'obtention de nouveaux schémas de trithérapie ou de quadrithérapie, connus sous le nom de HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy). Cette trithérapie a révolutionné la thérapeutique antirétrovirale par sa capacité à diminuer la morbidité et la mortalité liées à l'infection à VIH/SIDA et d'accroître l'espérance de vie des patients (**Palella et coll., 1998**). Cependant, la gestion de l'infection à VIH est très complexe et demeure un problème lié au monitoring et à l'efficacité des ARV, la toxicité et la mauvaise tolérance des ARV et enfin, les échecs thérapeutiques et le développement des mutations de résistance (**Tourmond et coll., 2010 ; Tsibris et Hirsch, 2010**). L'ensemble de ces facteurs montrent, la nécessité de rechercher de nouvelles molécules et de nouvelles cibles

thérapeutiques avec plusieurs possibilités de combinaisons thérapeutiques (**Ghosh et coll., 2010**).

IV.1. Les molécules antirétrovirales

La synthèse des molécules antirétrovirales a commencé depuis l'instauration de la monothérapie dans les années 1987 et ensuite, vers 1995, le schéma standard de traitement des infections à VIH fut la combinaison de plusieurs molécules dénommé HAART (**Palella et coll., 1998**).

IV.1.1 Les différentes classes et molécules actuelles

Les molécules antirétrovirales approuvées par la FDA sont au nombre de 24, réparties en six classes : les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de la protéase, les inhibiteurs d'intégrase, les inhibiteurs d'entrée et les inhibiteurs de fusion (voir tableau I) (**Tang et Shafer, 2012**).

Tableau I : Les différentes classes et molécules antirétrovirales (Tang et Shafer, 2012)

Dénomination Commune Internationale (DCI)	Abréviation	Nom de spécialité
Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse		
Zidovudine	AZT	Rétrovir®
Didanosine	ddI	Videx®
Stavidune	D4T	Zérit®
Lamivudine	3TC	Epivir®
Emtricitabine	FTC	Emtriva®
Abacavir	ABC	Abacavir®
Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse		
Tenofovir	TDF	Viread®
Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse		
Névirapine	NVP	Viramune®
Efavirenz	EFV	Efavirenz®
Delavirdine	DLV	Rescriptor®
Rilpivirine	RPV	Edurant®
Etravirine	ETV	Intelence®
Inhibiteurs de la protéase		
Saquinavir	SQV	Invirase®
Ritonavir	RTV	Norvir®
Indinavir	IDV	Crixivan®
Amprenavir	APV	Agénérase®
Fosamprenavir	Fos-APV	Telzir®
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra®
Atazanavir	ATZ	Reyataz®
Tipranavir	TPV	Aptivus®
Darunavir	DRV	Prézista®
Inhibiteurs de fusion		
Enfurvitide (T20)	ENF	Fuzéon®
Inhibiteur du corécepteur CCR5		
Maraviroc	MRV	Celsentri®
Inhibiteurs de l'intégrase		
Raltegravir	RVG	Isentress®
Elvitegravir	ELV	Stribild®

IV.1.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (TI)

Chez tous les rétrovirus, la transcriptase inverse est essentielle pour la synthèse de l'ADN génomique avant son intégration dans le chromosome cellulaire (**Sarafianos et coll., 2009**).

Cette fonction primordiale de la transcriptase inverse dans le cycle de la réPLICATION fait d'elle,

une cible dans la thérapie antirétrovirale. Les molécules inhibitrices de l'activité de la TI sont subdivisées en deux classes : les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI (INTIs) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTIs) (**Menéndez-Arias, 2002**).

IV.1.1.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI (INTIs)

Les INTIs sont les premières molécules commercialisées dans la thérapie antirétrovirale (**Young, 1988**). Les INTIs sont des analogues aux nucléotides naturels, à la seule différence qu'ils leur manquent le groupe 3'-OH. Cette caractéristique leur donne le nom de terminateur de chaîne. Etant des analogues aux nucléotides naturels, ils agissent par compétition et comme ils n'ont pas le groupement -OH en position 3', leur fixation va entraîner un arrêt de la transcription. Cependant, l'ensemble des ces inhibiteurs, à l'exception du Tenovir, nécessite une tri-phosphorylation avant de devenir actifs. Ils sont ainsi appelés les inhibiteurs nucléosidiques de la TI (**Mehellou et De Clercq, 2010**). La forme active du tenovir est plus rapide car il ne demande que deux phosphorylations supplémentaires et il est le seul inhibiteur nucléotidique de cette classe (**Tsibris et Hirsch, 2010**).

IV.1.1.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTIs)

Les INNTIs forment la seconde classe de molécules inhibitrices de l'activité de la transcriptase inverse, mais pas comme compétitrices aux nucléotides naturels à l'instar des INTIs. La quasi-totalité des INNTIs de première génération ont le même mécanisme d'action, en se fixant au niveau d'une poche hydrophobe. Ce qui fait qu'une seule mutation à ce point entraîne une déficience dans l'activité de ces molécules (**Tsibris et Hirsch, 2010**). La poche hydrophobe se trouve dans la p66, principalement dans la paume de l'enzyme, à une distance environ de 10 Angstrom du site actif de l'ADN polymérase et de 60 Angstrom à celui de la RNase H (**Kohlstaedt et coll., 1992**). La poche a une configuration fermée en absence d'INNTIs, comblée par les chaînes latérales des acides aminés Y181 et Y188. L'ouverture de cette poche hydrophobe est induite par la fixation des INNTIs (**Zhou et coll., 2006**). Lors de la fixation d'un INNTI, les acides aminés Y181 et Y188 sont déplacés, ce qui empêchera l'activité enzymatique de la TI (**Sluis-Cremer et coll., 2004**). La fixation de l'INNTI entraîne un changement de position du pouce, qui prend une position encore plus extrême que celle qu'il devrait prendre pour la liaison à l'amorce. Ce positionnement pourrait altérer les changements de conformation, nécessaires à la polymérisation (**Sluis-Cremer et coll., 2004**).

La fixation de l'INNTI dans la poche hydrophobe entraîne par un mécanisme allostérique, une perturbation des résidus D185 et D186 (motif YMDD) qui coordonnent avec les ions Mg²⁺, la polymérisation. Ce changement pourrait positionner le dNTP (désoxynucléotides triphosphates) d'une manière impropre à l'incorporation (**Esnouf et coll., 1995**). C'est une région moins conservée, ce qui explique certainement la prédisposition du virus à développer rapidement des résistances vis à vis de ces molécules (**De Clercq, 1998**). Cette notion de faible nombre de mutations pour que le virus devienne résistant aux molécules antirétrovirales définit la barrière génétique et c'est ce qui est l'origine de la distinction des INNTIs en trois générations. La première génération est composée de la nevirapine et de la delavirdine approuvé par la FDA en 1996 et 1997 respectivement. En 1998, l'efavirenz est approuvé comme appartenant à la seconde génération des INNTIs. Ces molécules de 1^{ère} et 2^{nde} génération ont une faible barrière génétique car une seule mutation peut entraîner la résistance à ces molécules (**Jochmans et coll., 2009**). Elles sont alors administrées aux patients dès le début du traitement ARV, période pendant laquelle, le virus n'a pas encore accumulé des mutations de résistance à cette classe (**Tsibris et Hirsch, 2010**). Cependant, l'etravirine, qui est une molécule de 3^{ième} génération, a une barrière génétique élevée et demande une accumulation de plusieurs mutations pour devenir inefficace, raison pour laquelle, elle est souvent utilisé pour le traitement des patients ayant accumulé plusieurs mutations de résistance aux INNTIs et dont les molécules des générations précédentes ne sont plus efficaces (www.intelence-info.com/intelence/fullprescribing-info.html). L'ensemble des INNTIs ont une demi-vie longue (25-55h). Ils sont métabolisés par le foie et constituent un substrat pour le cytochrome P. Bien que la structure de la TI du VIH-2 présente de fortes homologies avec la TI du VIH-1, les INNTIs n'ont pas d'activité sur le VIH-2 et non plus sur le VIH-1, groupe O (**Tsibris et Hirsch, 2010**). Cette perte d'activité est causée par un changement au niveau des résidus des codons 181 et 188 (Tyr181, Tyr188 pour le VIH-1 et Ile181, Leu188 pour le VIH-2), ce qui empêche la liaison des INNTIs à la TI du VIH-2 (**Sluis-Cremer et coll., 2004**).

IV.1.1.2. Les inhibiteurs de la protéase

Le rôle de la protéase dans les processus de maturation des particules virales, fait d'elle une véritable cible pour la thérapie antirétrovirale. Les molécules de cette famille ont donc une forte affinité avec le site actif de la protéase, dont elles inhibent l'activité enzymatique de manière irréversible (**Boden et Markowitz, 1998**). Les inhibiteurs de la protéase agissent par compétition aux substrats naturels de la protéase, à l'exception du tipranavir, ils sont donc

peptidomimétiques. Ils sont souvent associés avec une faible dose de ritonavir et on parlera d'IPs boostés, pour améliorer la demi-vie des molécules grâce à l'activité inhibitrice du ritonavir sur le cytochrome P450 (**Kempf et coll., 1997**). Les IPs sont subdivisés en deux groupes selon l'efficacité, la tolérance et la durée de la demi-vie. Ainsi, les IPs de 1^{er} groupe (IP de 1^{ière} génération) comprennent : saquinavir, ritonavir, indinavir et nelfinavir. Ils sont caractérisés par une demi-vie courte, ce qui augmente le nombre de prises journalière, une barrière génétique faible et une efficacité réduite. Par contre, la majeure partie des IPs de second groupe (2^{nde} génération) que sont : fosamprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir et darunavir, sont boostés et permettent ainsi d'augmenter la durée de la demi-vie et la barrière génétique de ces molécules (**Danner et coll., 1995**).

IV.1.1.3. Les inhibiteurs d'intégrase

Les inhibiteurs d'intégrase constituent une nouvelle famille de molécules antirétrovirales. La fonction essentielle de l'intégrase dans le transfert et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, fait des inhibiteurs d'intégrase, une nouvelle option thérapeutique chez les patients infectés, aussi bien par le VIH-1 comme par le VIH-2 (**Garrett et coll., 2008**). Deux molécules sont actuellement disponibles : le raltegravir et l'elvitegravir. Elles appartiennent à la famille des inhibiteurs sélectifs du transfert de brin et agissent en se fixant sur le complexe de pré-intégration. Il en résulte un blocage sélectif du transfert de brin et par conséquent un arrêt du processus d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (**Mouscadet et coll., 2007**). Le raltegravir est la première molécule à être commercialisée en 2008 et les résultats d'une étude, dans le cadre d'un traitement optimisé, ont montré une faveur du raltegravir, puisqu'à 48 semaines, 72% des patients inclus dans ce bras ont une charge virale inférieure à 400 copies/ml contre 37% des patients dans le bras placebo (**Steigbigel et coll., 2008**). L'elvitegravir est le second inhibiteur d'intégrase, qui contrairement au raltegravir, est métabolisé par le cytochrome 34A et présente la particularité de devoir être co-administré avec du ritovavir pour augmenter sa concentration plasmatique (**Bonnard et Pialoux, 2009**). Les inhibiteurs d'intégrase ont plusieurs avantages par rapport aux différentes classes citées ci-dessus car leur activité n'est pas affectée par le tropisme, leur tolérance digestive est bonne et ils n'ont pas de toxicité métabolique. Cependant, leur utilisation précoce demande une observance parfaite en raison de leur barrière génétique faible. De plus, les résistances sont largement croisées entre ces deux molécules, ce qui limiterait les possibilités thérapeutiques en cas d'échec (**Véronique et Yeni, 2009**).

IV.1.1.4. Les inhibiteurs d'entrée et de fusion

L'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles est un processus à plusieurs étapes qui nécessite une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe du virus, le récepteur CD4 de la cellule hôte et les corécepteurs (CCR5 et/ou CXCR4). Ces corécepteurs représentent aussi une cible de la thérapie antirétrovirale. Cependant, seules deux molécules sont aujourd'hui disponibles : le maraviroc et l'enfuvirtide (T-20). Elles ont une action allostérique car leur fixation entraîne un changement de conformation. Le maraviroc est responsable de modifications au niveau de l'interaction gp120-CCR5 et l'enfuvirtide au niveau de la gp41 (**Kuritzkes, 2011**). Ces modifications de conformation auront comme conséquence l'inhibition de l'entrée du génome viral dans la cellule hôte. Le maraviroc est le premier antagoniste de CCR5 approuvé mais son utilisation est très limitée car il n'est actif que sur les virus à tropisme R5, utilisant le CCR5 comme corécepteur (**Gulick et coll., 2008**). Des résistances à l'enfuvirtide sont occasionnées par des substitutions dans la région HR1 de la gp41 (**Kuritzkes, 2011**).

IV.1.2 Les molécules antirétrovirales en développement

L'efficacité des différentes molécules antirétrovirales est limitée par plusieurs facteurs : les interactions entre molécules de la même classe et de classes différentes, la toxicité, l'hypersensibilité et la résistance du VIH-1 aux différentes molécules des différentes classes. Compte tenu de ces différents facteurs limitants, la synthèse de nouvelles molécules avec des mécanismes d'action différents, demeure indispensable pour minimiser encore la résistance du VIH-1 aux ARV et les effets secondaires liés au traitement antirétroviral (**Cihlar et Ray, 2010**).

Les INTIs qui existent actuellement sont des terminateurs de chaîne qui agissent en compétition par rapport aux dNTP naturels. Il y'a d'autres INTIs en développement qui ont le même mécanisme d'action que les précédents mais avec des différences capitales et d'autres dont le mécanisme d'action diffère des INTIs actuels. Parmi ceux qui ont le même mécanisme d'action que les précédents, nous pouvons citer :

- l'apricitabine, ATC ; c'est une molécule qui ne manifeste pas de toxicité et est très recommandée pour le traitement des patients ayant développé des résistances à la 3TC et au FTC. Cependant, elle présente des interactions négatives, si elle est co-administrée avec ces dernières (**Bethell et coll., 2007**),

- l'elvucitabine, L-d4T ; cette molécule, non seulement n'a pas d'effet de toxicité, mais elle a un effet régulateur sur la toxicité causée par d'autres molécules antirétrovirales (**Hammond et coll., 2005**),
- l'amdoxovir, DAPD ; c'est une molécule qui, même pendant sa tri-phosphorylation, est déjà active et elle a une barrière génétique élevée (**Mewshaw et coll., 2002**).

Pour les nouvelles molécules de la classe des INTIs avec un nouveau mécanisme d'action, nous pouvons citer : les TDRTIs (Translocation-Defective RT Inhibitor), les DCTRTIs (Delayed Chain Terminator RT Inhibitor) et les LMRTIs (Lethal Mutagenesis RT Inhibitor) (**Esposito et coll., 2012**).

- Les TDRTIs sont des INTIs qui ont la capacité de bloquer la translocation de la transcriptase inverse après leur fixation. Ce sont des analogues des nucléotides naturels et diffèrent des premiers INTIs car ils possèdent la liaison OH en position 3'. Ils ont aussi la possibilité d'inhiber la survenue des mutations de résistance qui affectent la quasi-totalité des autres INTIs (**Hayakawa et coll., 2004**).
- Les DCTRTIs, à l'instar des TDRTIs, ont la liaison 3'-OH et permettent la fixation des nucléotides naturels. Cependant, leur fixation bloque l'élongation par encombrement stérique entre l'ARN et l'ADN en cours de formation (**Esposito et coll., 2012**).
- Les LMRTIs sont des inhibiteurs dont leur fixation entraîne la survenue de plusieurs mésappariements, des mutations en nombre très élevé qui ont comme effet la répression de la réPLICATION virale (**Esposito et coll., 2012**).

Les INNTIs sont caractérisés par leur faible barrière génétique, leur forte toxicité et des réactions d'hypersensibilité. La recherche de nouvelles molécules est surtout basée sur leur capacité de rester actifs devant certaines mutations spécifiques de résistance aux INNTIs qui existent déjà et qui auront une capacité de modifier la conformation du site actif de la TI. C'est sur cette base que l'etravirine, molécule déjà approuvée a été synthétisée plus la dipavirine, molécule en cours d'investigation (**Zhan et coll., 2009**). Il y'a aussi des INNTIs de 4^{ème} génération en cours d'évaluation, à savoir le rilpivirine et le lersivirine (**Alcaro et coll., 2011**).

Une nouvelle classe de molécule est en cours d'investigation. Il s'agit d'inhibiteurs de la TI à travers l'activité de la RNase H. Ces molécules sont donc des inhibitrices de la RNase H. Ce sont des chélateurs d'ion magnésium qui ciblent le site actif de la RNase H. Cependant, elles sont à l'origine d'une forte toxicité cellulaire (**Lansdon et coll., 2011**).

La faible barrière génétique des inhibiteurs d'intégrase actuels est à l'origine du développement d'une deuxième génération d'inhibiteurs de cette classe et deux molécules sont en cours d'évaluation : le MK-2048 et le dolutegravir.

- Le MK-2048 est une molécule qui a montré son efficacité dans le traitement des HTLV-1 (Human T-lymphotropic Virus 1) et peut être utilisée dans la prévention de l'infection à VIH. Elle n'a pas d'effet de toxicité et peut être actif chez les virus ayant développé des résistances au raltegravir et à l'elvitegravir (**Al-Mawsawi et coll., 2008, Goethals et coll., 2011**).
- Le dolutegravir, en évaluation clinique de phase III est un potentiel candidat qui inhibe les réactions de transferts durant l'intégration (**Yoshinaga et coll., 2010**).

Vu que, la transcriptase inverse et l'intégrase ont de fortes similarités fonctionnelles, le développement d'inhibiteurs de classe hybride, pouvant inhiber, à la fois la TI et l'intégrase est en cours d'investigation (**Tang et coll., 2011**).

Le développement de virus résistants à la suite de mutations liées à la faible barrière génétique des inhibiteurs de fusion actuels, la synthèse de nouvelles molécules qui sont des peptides, plus performantes que la T-20 chez les virus résistants ont vu le jour (**Miyamoto et Kodama, 2012**). Parmi ces peptides, nous avons :

- la C34, un dérivé peptidique qui a montré plus d'efficacité dans l'inhibition de la fusion comparé à la T-20 (**Nameki et coll., 2005**),
- la T-1249, une séquence de polypeptides de 39 acides aminés, obtenue à partir du VIH-1, VIH-2 et VIS. Cette molécule a été parfaitement optimisée de telle sorte qu'elle garde son activité dans le traitement des virus résistants à la T-20 (**Lalezari et coll., 2005**),
- la T-2410, un polypeptide de 38 acides aminés qui a la particularité d'être actif à la fois sur le virus sauvage que sur les variants mutés dont la T-20 ne montre plus d'efficacité (**Dwyer et coll., 2007**).

IV.2. La résistance aux ARV

L'objectif du traitement antirétroviral est de transformer l'infection virale, pouvant aboutir au SIDA, en une infection chronique (**Tsibris et Hirsch, 2010**). La thérapie antirétrovirale repose sur l'association d'inhibiteurs des différentes enzymes virales nécessaires à la réPLICATION du virus. Un traitement ARV efficace doit contribuer à une charge virale plasmatique indéTECTABLE, inférieure à 50 copies/ml (**Gazzard et coll., 2008**). Cette inhibition de la réPLICATION virale est associée une remontée des CD4, cellules de défense du système

immunitaire et à une amélioration clinique par le contrôle des infections opportunistes, dues à la reconstitution immunitaire (**Delaugerre et coll., 2007**). La multiplicité des molécules antirétrovirales permet aux les cliniciens à prendre des décisions plus appropriées et un bon choix des molécules en poly-thérapie (**Diamond et Descamps, 1998**). Dans un principe de la standardisation et sur la base des résultats de recherches biologiques et cliniques, des recommandations ont été développées dans le choix de différents schémas thérapeutiques contre l'infection à VIH-1. Selon les nouvelles recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans les pays à ressources limitées, tout patient ayant un taux de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³ doit être mis sous ARV, quel que soit le stade clinique de l'OMS. Ce traitement ARV doit comprendre deux INTIs et un INNTI pour la première ligne et deux INTIs plus un IP boosté pour la seconde ligne en cas d'échec de la ligne précédente. Le monitoring du traitement antirétroviral se fait par une quantification de la charge virale plasmatique et une numération du taux de CD4 tous les six mois avec une visite clinique mensuelle (**Laurent et coll., 2002**). Pour maintenir un schéma thérapeutique, il faut qu'il soit efficace. Cette efficacité est mesurée en termes de tolérance, de toxicité des ARV à long terme mais surtout, de l'apparition de virus résistants (**Delaugerre et coll., 2007**).

IV.2.1. Définition de la notion de résistance

La résistance du VIH aux ARV est définie comme étant la capacité du virus à se répliquer en présence d'inhibiteurs. Cette résistance est le résultat d'une grande diversité génétique par la présence de quasi-espèces, due principalement aux erreurs de la transcriptase inverse lors de la réPLICATION virale. Trois types de résistance ont été définis :

- la résistance naturelle, c'est le cas du changement au niveau des résidus des codons 181 et 188, qui cause la résistance naturelle du VIH-2 aux INNTIs (**Sluis-Cremer et coll., 2004**),
- la résistance primaire ou résistance transmise, comme son nom l'indique, c'est quand la personne s'infecte d'emblée par un virus déjà résistant et que cette personne n'est pas encore sous thérapie antirétrovirale (**Delaugerre et coll., 2007**),
- la résistance secondaire (acquise ou induite), elle est liée à l'émergence de souches comportant des mutations dans les gènes qui codent les cibles des antirétroviraux sous l'effet de la pression de sélection d'un traitement non optimal. On considère que les mutations de résistance préexistent à l'instauration de la thérapie. Ce traitement va agir sur les virus sauvages et si la réPLICATION persiste pour une cause quelconque, les virus

mutants vont être sélectionnés et deviendront progressivement la population majoritaire (**Diamond et Descamps, 1998**). Les différentes causes de la persistance de la réPLICATION virale sont : l'effet de l'antirétroviral non suffisant, une mauvaise observance du traitement, une absorption insuffisante et les interactions médicamenteuses (figure 27) (**Delaugerre et coll., 2007**).

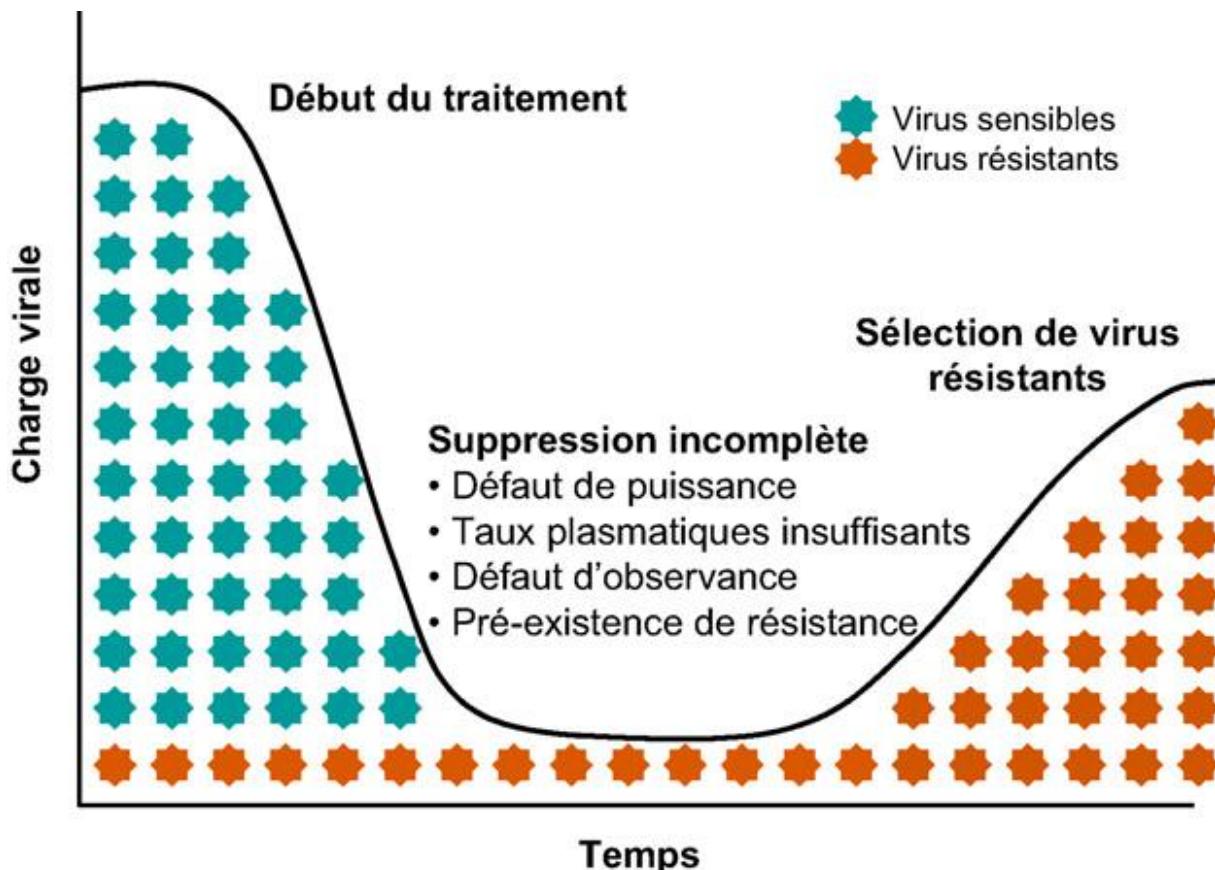


Figure 27 : Mécanisme de sélection de virus résistants sous traitement ARV (Delaugerre et coll., 2007)

IV.2.2. Les mutations associées à une résistance aux ARV

L'identification des mutations pouvant être associées à une réduction de la sensibilité des souches virales aux antirétroviraux, se fait par des tests génotypiques (conférer chapitre IV.3.1). La caractérisation des ces mutations de résistance est basée sur des résultats de corrélation entre : mutations et sensibilité des ARV sur des échantillons cliniques, mutations et histoire thérapeutique des patients sous ARV et enfin mutations et réponse virologique par rapport à une nouvelle molécule antirétrovirale (**Shafer, 2002**). Il convient cependant de distinguer différentes catégories de mutations :

- **les mutations primaires** (mineures) : ce sont des mutations qui, à elles seules, ont un impact direct sur la sensibilité des virus à une ou plusieurs molécules antirétrovirales,
- **les mutations secondaires** (majeures) : ces mutations auront un impact sur l'efficacité des ARV que quand elles sont associées aux mutations primaires (**Shafer, 2002**).
- **les mutations accessoires polymorphes et non polymorphes**, qui peuvent entraîner une diminution de la sensibilité du virus aux molécules antirétrovirales (**Bacheler et coll., 2000**).

IV.2.2.1. Les mutations de résistance aux INTIs

Les molécules antirétrovirales ont été synthétisées dans le but de stopper la réPLICATION virale. Cependant, le virus a la possibilité de développer des mécanismes de résistance lui permettant de se multiplier en présence de ces inhibiteurs. Pour les INTIs, deux mécanismes impliqués dans la résistance ont été distingués :

- l'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé. Elle est conférée par les mutations appelées TAMs (Thymidine Analog Mutations). Elles sont sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, la zidovudine et la stavudine, et comprennent : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Ces mutations favorisent l'accès de l'ATP au site de polymérisation qui réagit avec l'analogue nucléosidique en le détachant de la chaîne d'ADN viral en formation. Les TAMs sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTIs, sauf à la lamivudine, et cela à des niveaux divers. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAMs et de l'INTI. Par ailleurs, les mutations K70R et K219Q/E ont moins d'impact que les quatre autres dans cette résistance croisée. La mutation M184V, en présence de TAMs, augmente la résistance *in vivo* à l'abacavir et n'a pas d'impact sur le ténofovir et la didanosine (**Menéndez-Arias, 2008 ; Yeni, 2010**).

- la diminution d'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels, est observée avec certaines mutations. Ce mécanisme a été décrit pour les mutations M184V, Q151M et son complexe (mutations A62V, V75I, F77L, F116Y), ainsi que pour les mutations L74V, K65R et K70E. La mutation Q151M entraîne une résistance de haut niveau à tous les INTIs sauf au ténofovir et à la lamivudine (**Menéndez-Arias, 2008 ; Yeni, 2010**).

La liste des mutations associées à une résistance aux INTIs, selon l'algorithme de stanford est mentionnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Les différentes mutations de résistance aux INTIs
[\(http://hivdb.stanford.edu/\)](http://hivdb.stanford.edu/), Novembre 2011)

	Mutations Discriminatives				TAMs						Mutations Complexes
	184^a 65 74 115				41 67 70 210 215 219						69 151
Consensus	M^b	K	L	Y	M	D	K	T	Y	K	T Q
3TC^d	VI^c	R									<i>Ins M</i>
FTC	VI	R									<i>Ins M</i>
ABC	VI	R	VI	F	<i>L</i>		<i>W</i>	<i>FY</i>			Ins M
ddI	VI	R	VI		<i>L</i>		<i>W</i>	<i>FY</i>			Ins M
TDF	***	R	*	F	<i>L</i>	<i>R</i>	<i>W</i>	<i>FY</i>			Ins M
D4T	***	R			<i>L</i>	<i>N</i>	<i>R</i>	<i>W</i>	FY QE		Ins M
ZDV	***	***	*		<i>L</i>	<i>N</i>	R	<i>W</i>	FY QE		Ins M

^a : la position de la mutation sur le gène pol (transcriptase inverse),

^b : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus sauvage,

^c : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus muté,

^d : la molécule antirétrovirale à laquelle le virus devient résistant à la suite d'une mutation donnée,

Gras : résistance de haut niveau,

Italique : résistance de faible niveau.

Les mutations discriminatives sont celles dont, la survenue entraîne l'inhibition de la fixation des INTIs. La mutation M184V est une des plus fréquentes de ce groupe car elle est causée par des molécules de première ligne selon les recommandations de l'OMS. Et par conséquent, cette mutation entraîne une résistance de haut niveau au FTC et 3TC. Cependant, elle augmente la sensibilité à l'AZT et au TDF (**Whitcomb et coll., 2003**). Les effets cliniques de cette mutation sont influencés par la présence ou l'absence d'autres mutations. Par exemple, la présence des mutations K65R ou L74V en plus de la M184V, suffit pour causer une résistance élevée au ddI et ABC. Par contre la M184 nécessite la présence de trois TAMs pour entraîner une résistance élevée à l'ABC et au ddI (**Rhee et coll., 2004**). L'apricitabine, qui est une nouvelle molécule de la classe des INTIs est une bonne alternative pour les patients qui ont des résistances à la lamivudine et à l'emtricitabine (**Cahn and Wainberg, 2010**).

Les TAMs sont des mutations, qui sont responsables d'une excision des INTIs incorporés et d'une continuation de la réPLICATION. Elles sont sélectionnées par les analogues de la thymidine à savoir : l'AZT et le d4T et elles provoquent une résistance élevée (**Whitcomb et coll., 2003**). Ces mutations sont aussi responsables de résistance du virus aux molécules

comme : ABC, ddI et TDF. Les TAMs sont ainsi subdivisés en deux types : TAMs de type I (M41L, L210Y et T215Y), qui sont responsables de résistance de haut niveau à l'ABC, ddI et TDF, et les TAMs de type II (D67N, K70R, T215F, et K219QE) qui n'entraînent pas de résistances de haut niveau mais conduisent à une réduction de la sensibilité du virus aux analogues de la thymidine (**Cozzi-Lepri et coll., 2005**).

Les mutations complexes sont responsables de résistances multiples aux INTIs et sont souvent associées à la M184V ou aux TAMs. L'insertion au codon 69 est souvent associée aux TAMs et entraîne une résistance croisée, plus particulièrement au FTC et 3TC mais aussi à l'ensemble des INTIs (**Prado et coll., 2004**). Le complexe Q151M, à elle seule, est responsable d'une résistance élevée à l'AZT, d4T, ddI et ABC (**Iversen et coll., 1996**).

D'autres mutations non polymorphes ont également été décrites dans le domaine de la polymérase (K43E/Q/N, H208Y, D218E, K223Q et L228H/R) qui sont souvent associées aux TAMs et ont un effet sur la sensibilité du virus aux INTIs (**Rhee et coll., 2004**)

IV.2.2.2. Les mutations de résistance aux INNTIs

Les INNTIs de 1^{ère} génération bloquent la transcriptase inverse (TI) en se fixant au niveau d'une poche hydrophobique étroite et proche du site actif de l'enzyme (**Tsibris et Hirsch, 2010**). Une seule mutation à ce niveau peut entraîner une résistance de haut niveau à l'INNTI. Ce sont typiquement des molécules dont la «barrière génétique» est basse puisqu'une seule mutation leur confère généralement une résistance élevée et croisée à l'ensemble des INNTIs (**Deeks, 2001**). Le tableau ci-dessous présente la liste des mutations associées à une résistance aux INNTIs.

Les mutations K103N et Y181C sont les plus fréquentes des mutations qui émergent à la suite d'échec thérapeutique sous INNTIs (**Dykes et coll., 2001**). Elles entraînent une résistance croisée et élevée à tous les INNTIs (**Deeks, 2001**). Les mutations au niveau des positions 103, 106, 181, 188 et 190 sont qualifiées de primaires car elles apparaissent très tôt pendant l'échec virologique, comparées aux mutations en positions 100 et 101 (**Kovalet coll., 2006**). La mutation M230L fait partie des plus rares mutations et elle est souvent associée à la E138K chez les patients sous rilpivirine (**Rimsky et coll., 2012**). Chacune de ces mutations est à l'origine de résistance de haut niveau, mais, les patients avec ces mutations peuvent être sous etravirine. Cependant, les mutations aux positions 181 et 190 compromettent l'efficacité de l'etravirine (**Madruga et coll., 2007**). La mutation Y181I/V isolée, réduit de manière significative la réponse virologique à l'etravirine (**Marcelin et coll., 2010**). Pour les INNTIs, à côté des mutations primaires et secondaires, il faut aussi distinguer les mutations accessoires

non polymorphes et polymorphes. Les mutations accessoires non polymorphes (V90I, A98G, V108I, V179D/E/F et H221Y) peuvent entraîner une diminution de la sensibilité aux INNTIs, en association avec d'autres mutations. Les accessoires polymorphes (V90I, V108I, et V179D), sont souvent retrouvées chez les sujets naïfs et modulent les effets des autres mutations de résistance aux INNTIs (**Bacheler et coll., 2000**). C'est ainsi que les associations de mutations suivantes : E138A+V179I, Y181C+H221Y et V90I+Y181C, entraînent une réduction de la sensibilité du virus à l'etravirine qui est un INNTI de 2^{nde} génération (**Maïga et coll., 2009**)

Tableau III : Les différentes mutations de résistance aux INNTIs
[\(http://hivdb.stanford.edu/\)](http://hivdb.stanford.edu/), Novembre 2011)

Mutations majeures de résistance aux INNTIs									
	100 ^a	101	103	106	138	181	188	190	230
Consensus	L ^b	K	K	V	E	Y	Y	G	M
NVP^d	I ^c	EP	NS	AM		CIV	LHC	ASE	L
EFV	I	EP	NS	AM		CIV	LHC	ASE	L
ETR	I	EP			AGKQ	CIV	L	ASE	L
RPV	I	EP			AGKQ	CIV	L	ASE	L

^a : la position de la mutation sur le gène pol (transcriptase inverse),

^b : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus sauvage,

^c : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus muté,

^d : la molécule antirétrovirale à laquelle le virus devient résistant à la suite d'une mutation donnée,

Gras : résistance de haut niveau,

Italique : résistance de faible niveau.

IV.2.2.3. Les mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase

La résistance aux IPs est liée à des mutations situées d'une part au niveau du site actif de l'enzyme (mutations primaires) et d'autre part à distance de celle-ci (mutations secondaires). Il a été démontré que la résistance aux IPs est un phénomène graduel avec une accumulation progressive de mutations, ce qui est à l'origine de la distinction des mutations primaires aux secondaires (**Delaugerre et coll., 2007**). Le tableau IV ci-dessous montre les différentes mutations associées à une résistance aux IPs

Tableau IV : Les différentes mutations de résistance aux IPs
[\(http://hivdb.stanford.edu/\)](http://hivdb.stanford.edu/), Novembre 2011)

Mutations majeures de résistance aux IPs													
	30 ^a	32	46	47	48	50	54		76	82	84	88	90
Consensus	D^b	V	M	I	G	I	I		L	V	I	N	L
ATV/r^d	<i>I</i>	<i>IL</i>	<i>V</i>	VM	L	VTALM			ATFS	V	S	M	
DRV/r	I^c		VA		V	LM		V	F		V		
FPV/r	I	IL	VA		V	VTALM		V	ATSF	V		M	
IDV/r	<i>I</i>	<i>IL</i>	<i>V</i>			VTALM		V	AFTS	V	S	M	
LPV/r	I	IL	VA	VM	V	VTALM		V	AFTS	V		M	
NFV	N		IL	V	VM	VTALM			AFTS	V	DS	M	
SQV/r					VM	VTALM			AT	V	S	M	
TPV/r		<i>I</i>	<i>IL</i>	VA			VAM		TL	V			

^a : la position de la mutation sur le gène pol (protéase)

^b : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus sauvage,

^c : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus muté,

^d : la molécule antirétrovirale à laquelle le virus devient résistant à la suite d'une mutation donnée,

Gras : résistance de haut niveau,

Italique : mutations accessoires,

Gras et surligné : résistance possible.

Les positions de mutations en gras sont responsables d'une résistance de haut niveau et celles en gras et surlignées, sont à l'origine de résistance possible. Pour ces mutations, d'autres molécules en alternative, peuvent être utilisées (**Schapiro et coll., 2010**). Les positions en italique par contre, sont des mutations secondaires qui ont un effet de résistance que si elles sont associées aux autres mutations (**Descamps et coll., 2009**). Parmi les mutations primaires, la V82A/F/T/S est la plus fréquente et survient chez les patients sous IDV/r (**Martinez-Cajas et Wainberg**). Une résistance croisée à l'IDV/r et au SQV/r est observée chez les virus ayant développé les mutations suivantes : N88D et L90M. Il faut aussi noter que la mutation L90M suffit à elle seule pour engendrer une résistance à tous les IPs (**Dronda et coll., 2001**). Parmi les mutations secondaires, celle à la position 63 est la plus fréquente et la L63P est retrouvée à 45% chez les sujets naïfs de traitement antirétroviral (**Kantor et coll., 2001**). Les mutations accessoires, sélectionnées par les IPs, comprennent des mutations polymorphiques (I13V, D60N, I62V, V77I et I93L) et non polymorphiques (V11I, K20T/V/I, L23I, L24I/F, L33F,

K43T, F53L, Q58E, A71V/T/I/L, G73S/T/C/A, T74P/S, N83D, et L89V) (**Descamps et coll., 2009**).

IV.2.2.4. Les mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase

Les résistances aux inhibiteurs d'intégrase sont dues à des mutations au niveau du site actif de l'enzyme (**Hare et coll., 2010**). Le tableau V ci-dessous donne la liste des mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase.

Tableau V : Les différentes mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase
[\(http://hivdb.stanford.edu/\)](http://hivdb.stanford.edu/), Novembre 2011)

Mutations majeures de résistance aux inhibiteurs d'intégrase							
	66 ^a	92	140	143	147	148	155
Consensus	T ^b	E	G	Y	S	Q	N
Raltegravir (RAL) ^d	A ^c	Q	SA	RCH	G	HRK	H
Elvitegravir (ELV)	IAK	Q	SA		G	HRK	H
Dolutegravir (DTG)		Q	SA			HRK	

^a : la position de la mutation sur le gène pol (l'intégrase),

^b : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus sauvage,

^c : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus muté,

^d : la molécule antirétrovirale à laquelle le virus devient résistant à la suite d'une mutation donnée,

Gras : résistance de haut niveau,

Italique : résistance de faible niveau.

Il a été démontré que la présence d'une seule mutation peut entraîner la résistance du virus au RAL ou au ELV, ce qui atteste de la barrière génétique faible de ces molécules (**Véronique et Yeni, 2009**). La résistance au RAL est causée par trois principales mutations aux positions Y143, N155 et Q148. En plus de ces mutations primaires, nous avons d'autres mutations secondaires que sont : E92Q, Q148K/R/H et G140S/A. Les mutations comme le N155H et Q148H sont responsables de résistances croisées entre le RAL et le ELV (**Blanco et coll., 2011**). Les mutations à la position 148 entraînent aussi une baisse de l'efficacité d'un traitement sous dolutegravir (**Clotel et coll., 2010**)

IV.2.2.5. Les mutations de résistance aux inhibiteurs de fusion

Des résistances à l'enfuvirtide sont occasionnées par des substitutions dans la région HR1 de la gp41. Il n'existe pas de résistances croisées entre l'enfuvirtide et les inhibiteurs de CCR5

comme le maraviroc (**Kuritzkes, 2011**). Une liste des mutations associées à une résistance à l'enfuvirtide est disponible dans l'algorithme de stanford (tableau VI)

Tableau VI : Les différentes mutations de résistance à l'enfuvirtide
[\(http://hivdb.stanford.edu/\)](http://hivdb.stanford.edu/), Novembre 2011)

Mutations de résistance à l'enfuvirtide								
	36 ^a	37	38	40	42	43	44	45
Consensus	G ^b	I	V	Q	N	N	L	L
Enfuvirtide^d	DEVS ^c	V	EAMG	H	T	DKS	M	M

^a : la position de la mutation sur le gène env

^b : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus sauvage,

^c : l'acide aminé correspondant à une position donnée sur le virus muté,

^d : la molécule antirétrovirale à laquelle le virus devient résistant à la suite d'une mutation donnée,

Gras : résistance de haut niveau,

Italique : résistance de faible niveau.

L'enfuvirtide est une molécule à faible barrière génétique puisqu'une seule mutation suffit pour causer la résistance à cette molécule et parmi ces mutations, nous pouvons citer : G36D/E/V, V38A/E, Q40H, N42T et N43D (**Cabrera et coll., 2006**). Contrairement à l'identification des mutations de résistance pour les molécules des différentes classes thérapeutiques, il n'y pas de liste de mutations définies comme étant associées à la résistance aux anti-CCR5 du fait que le profil des mutations varie d'un virus à un autre (**McNicholas et coll., 2010**).

IV.3. Méthodes d'étude de la résistance aux ARV

L'étude de la résistance du VIH-1 aux molécules antirétrovirales se fait principalement par deux tests différents mais complémentaires, à savoir : les tests génotypiques et les tests phénotypiques (**Yeni, 2010**).

IV.3.1. Les tests génotypiques

Ils permettent d'analyser les mutations présentent au niveau des différents gènes cibles des molécules antirétrovirales (TI, protéase, intégrase, *env*). Les tests génotypiques sont subdivisés en deux types : le séquençage nucléotidique et la détection des variants minoritaires (**Yeni, 2010**).

IV.3.1.1. Le séquençage nucléotidique

Elle représente la technique de référence pour l'amplification génomique et la détermination des mutations de résistance après séquençage selon la technique de Sanger. Ces tests sont basés sur la détection de la population majoritaire, c'est-à-dire, la population virale présente à plus de 20% chez un individu infecté (**Yeni, 2010**). Les mutations sont mises en évidence par séquençage des gènes d'intérêt et migration électrophorétique sur séquenceur. Des logiciels traduisent les séquences nucléotidiques en acides aminés et une analyse de chaque position connue comme étant associée ou non à une mutation de résistance par comparaison à une séquence de référence qui est une souche du sous-type B (HXB2, numéro d'accession : KO3455) (<http://www.hiv.lanl.gov>). L'interprétation des mutations associées à la résistance aux ARV est effectuée en utilisant les différents algorithmes disponibles que sont : l'algorithme de l'IAS (<https://www.iasusa.org/>), celui du groupe AC11 de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org/>), celui de Rega (<http://regaweb.med.kuleuven.be/>) et celui de l'université de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). L'utilisation de ces tests a permis le développement de kits commerciaux approuvés par la FDA, à savoir : le ViroSeq HIV-1 genotyping system v2.0 (Celera, Alameda, Californie, USA) et le Trugene HIV-1 genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) mais aussi, de techniques dites «maison» comme celle du groupe Résistance AC11 de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>) et celle décrite par Djoko et collaborateurs en 2011 (**Djoko et coll., 2011**). L'utilisation de ces techniques commerciales, approuvées à partir du sous-type B, dans les pays en voie de développement où prédominent des souches non-B, nécessite une évaluation en continue en les comparant surtout aux techniques « maisons» qui seraient plus adaptées sur ces souches non-B (**Chen et coll., 2007**)

Le ViroSeq HIV-1 geneotyping system v2.0 est une technique validée à partir des souches B dont la charge virale est supérieure à 2000 copies/ml. Il permet une amplification de la protéase et les 335 premiers codons de la transcriptase inverse. Après une extraction des acides nucléiques (ARN), une étape de rétrotranscription précède une seule étape de PCR afin de générer une séquence de 1800 paires de base. Les réactions de séquences sont effectuées en utilisant sept amorces dont quatre sens (A, B, C et D) et trois antisens (F, G et H). Les produits de séquences seront purifiés et analysés sur le séquenceur avec la technique des terminateurs de chaîne (Dye Terminator v3.1) d'Applied Biosystems (Courtabœuf, France). Le profil des différentes mutations de résistance est généré par le logiciel du système avec la version 2.8 selon les instructions du fabricant

(http://www.nearmedic.ru/upload/files/ViroSeq_HIV_1_GenotypingSystem.pdf). Des études antérieures ont démontré les performances de cette technique pour l'étude des mutations de résistance chez des souches B (**Cunningham et coll., 2001**) et non B du VIH-1 (**Mracna et coll., 2001**). Cependant une étude qui a été menée au Cameroun, a montré une différence de performance du ViroSeq sur des souches non B qui est liée à des différences de polymorphisme entre les souches B et non B du VIH-1 (**Aghokeng et coll., 2011**).

Le Trugene HIV-1 genotyping kit est associé au système OpenGene DNA Sequencing pour la détection des mutations de résistance des souches de VIH-1, sous-type B pour les gènes de protéase (codon 1-99) et de la transcriptase inverse (codon 40-247) à partir de prélèvements de patients dont la charge virale est supérieures à 1000 copies/ml. Le kit permet une rétrotranscription à partir d'extrait d'ARN selon une technique de notre choix, une étape de PCR et séquençage à partir d'amorces spécifiques des souches B, des CLIP reaction (Coupled AmpLIfication and sequencing steP) et une détection des bases après une migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide. Le OpenGene DNA Sequencing est un système automatisé qui donne une séquence d'ADN spécifique après la migration sur gel et le logiciel associé permet de générer un rapport de résistance contenant les différentes mutations par comparaison au VIH-1 de référence (<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/SubstantiallyEquivalent510kDeviceInformation/UCM088974.pdf>). Une étude effectuée sur des souches de VIH-1 sous-type B, a montré une bonne précision dans l'identification des bases (98,7%), et une bonne détection des positions de mutations associées à une résistance aux ARV (97,6%). Aucune différence significative n'a pas été notée pour des résultats issus de plusieurs laboratoires, utilisant différents lots et à des intervalles de manipulation différents ; ce qui atteste de la bonne reproductibilité de cette technique (**Grant et coll., 2003**). Les performances de cette technique ont été approuvées par comparaison d'échantillons originaux à ceux dilués jusqu'à 100 copies/ml. Aucune différence dans l'identification et la sensibilité de détection des mutations de résistance et des bases mixtes n'a été notée entre les échantillons et les dilués (**Gale et coll., 2006**). Il a été démontré que les succès d'amplification et de séquençage à partir de cette technique sont plus élevés pour les sous-types B que chez les non-B du VIH-1. Les analyses des séquences obtenues par Trugene, comparées à celles du ViroSeq, ont montré des différences en faveur du dernier. Cependant, ces différences n'ont pas d'impact dans l'interprétation clinique des mutations de résistance.

L'utilisation de ces techniques a amélioré l'étude de la résistance du VIH-1 sous-type B aux ARV, mais leur performance est moindre sur les souches non-B (**Beddows et coll., 2003**).

La technique de l'ANRS utilise le kit QIAmp Viral RNA (Qiagen, Valencia, Espagne) pour l'extraction des acides nucléiques (ARN). Ensuite, il faut une étape de rétrotranscription couplée à une étape de PCR nichée avec quatre amores, pour amplifier la protéase en entier et les 2/3 de la transcriptase inverse. Après une purification par migration électrophorétique, les réactions de séquences sont effectuées avec quatre amores dont deux sens et deux anti-sens. Les séquences obtenues seront analysées selon le principe du terminateur de chaîne à travers le séquenceur et le profil des mutations de résistance est fourni selon l'algorithme choisi. Le protocole complet de cette technique est décrit dans le site dédié (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Cette technique permet de rechercher des mutations sur des cibles plus larges (différents gènes) et à un coût moindre. Les résultats obtenus sont bien corrélés avec ceux des tests commerciaux (**Bigaillon et coll., 2010**).

La technique développée par Vergne et collaborateurs, comme celle de l'ANRS utilise le kit QIAmp Viral RNA (Qiagen, Valencia, Espagne) pour l'extraction de l'ARN génomique. Une étape de rétrotranscription avec le kit Expand transcriptase inverse de Roche (Roche Diagnostics, Meylan, France) permet l'obtention d'un brin d'ADNc. Ensuite, une étape de PCR nichée utilisant quatre amores permet d'obtenir un fragment de 1865 paires de bases couvrant la protéase et les 440 premiers acides aminés de la transcriptase inverse avec le kit Expand Long Template PCR system de Roche. Le produit de PCR est ensuite purifié avec le kit Geneclean Turbo (Q-Biogen, MPbiomedicals, France). Les réactions de séquences se feront avec sept amores dont quatre sens et trois anti-sens et l'analyse des séquences sur le séquenceur selon le principe du terminateur de chaîne. Le profil des mutations de résistance est fourni selon les différents algorithmes disponibles (**Vergne et coll., 2000 ; Djoko et coll., 2011**).

IV.3.1.2. la détection des variants minoritaires

Contrairement au séquençage nucléotidique qui ne détecte que les variants majoritaires, il existe différentes méthodes qui permettent de détecter les variants minoritaires, la population virale présente à moins de 20% chez un individu infecté. Parmi ces tests nous pouvons citer : la PCR allèle spécifique, le single génotype amplification (SGA, conférer III.4.2.4.) et les nouvelles techniques de séquençage à haut débit comme le pyroséquençage (ultradeep sequencing) (**Yeni, 2010**).

Avec l'avènement de la PCR en temps réel, des techniques de détection des mutations ponctuelles par des PCR spécifiques d'allèles ont vu le jour. Il s'agit de techniques extrêmement sensibles permettant de détecter des variants minoritaires. Cependant, chaque mutation nécessite une sonde individuelle, ce qui constitue une limite dans leur utilisation en routine, vu le nombre élevé des positions de mutations associées à une résistance aux ARV. C'est ainsi que la technique a été utilisée pour documenter la prévalence des mutations L90M (protéase), K103N et M184V (transcriptase inverse) chez une population en séroconversion en Angleterre. L'étude a montré que pour 50% des patients dont le virus est résistant, les mutations de résistance étaient portées par un variant minoritaire qui n'a pas été détecté par les techniques de séquençage classiques (**Metzner et coll., 2005**). En plus de ces trois positions de mutation, l'impact des positions de mutations suivants : M41L, K70R, Y181C et T215T/Y, au niveau de transcriptase inverse a été étudié. Les résultats ont démontré une prévalence relativement élevée des ces mutations portées par les variants minoritaires chez les patients en échec virologique, comparés à ceux avec succès thérapeutique. Ces résultats montrent que l'étude de la transmission des mutations de résistance par des techniques plus sensibles est d'une importance capitale surtout dans un contexte où l'histoire thérapeutique des patients n'est pas assez bien documentée (**Johnson et coll., 2008**).

La technique de pyroséquençage grâce à sa capacité de séquençage massif en parallèle pourrait également offrir des applications dans la détection des variants minoritaires en particulier pour la surveillance de la résistance transmise. Elle constitue aussi une application prometteuse dans la détection et la caractérisation moléculaire des différentes souches de VIH-1 comparée aux techniques de séquençage nucléotidique (**Wang et coll., 2007**). L'ultra-deep sequencing est une technique de pyroséquençage qui a montré une bonne précision et une reproductibilité. Cependant son automatisation et la diminution du délai pour obtenir un résultat sont indispensables pour son utilisation en routine (**Stelzl et coll., 2011**). L'utilisation de l'ultra-deep sequencing a montré une bonne alternative aux tests phénotypiques pour l'étude de tropisme afin de prédire la réponse du VIH-1 au traitement antirétroviral (**Kagan et coll., 2012**). Il existe des techniques de séquençage à haut débit qui ont été commercialisées comme le 454 Life Sciences de Roche (Basel, Switzerland), le Solexa/Genome Analyser d'Illumiba (San Diego, California, USA) et le SoLiD d'Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA). Elles constituent un nouveau challenge en bioinformatique par leur grande capacité à fournir des données en temps réel et le risque assez limité de la survenue des erreurs, comparées au séquençage classique, technique de Sanger (**Balzer et coll., 2010**).

IV.3.2. Les tests phénotypiques

Contrairement aux tests génotypiques, les tests phénotypiques ne sont pas utilisés en routine mais leur intérêt persiste dans l'évaluation de nouvelles molécules et chez les patients multi-traités. Ils consistent à mesurer la croissance virale en système cellulaire sous l'effet de concentrations croissantes d'ARV. Ils permettent ainsi de définir la concentration de l'antirétroviral inhibant 50% et 90% (CI_{50} et CI_{90} , exprimées en μM ou en nM) de la réPLICATION virale *in vitro* (**Damond et Decamps, 1998 ; Bigaillon et coll., 2010**). La résistance d'une molécule antirétrovirale se définit comme la capacité du virus à se multiplier en présence d'un composé, à des concentrations qui inhibent la réPLICATION d'un virus sensible. Ainsi, la diminution de la sensibilité d'une souche virale va se traduire par une augmentation des CI_{50} et CI_{90} . Il existe deux types de tests : les tests phénotypiques classiques et les tests utilisant des virus recombinants ou Recombinant Virus Assay (RVA) (**Damond et Decamps, 1998**).

Les tests phénotypiques classiques ont débuté depuis 1992 aux Etats Unis (**Japour et coll., 1993**). Ce sont des techniques qui nécessitent un isolement préalable du virus du patient, en général à partir des lymphocytes du sang périphérique. Cet isolat est ensuite cultivé, à différentes dilutions, en présence d'une gamme de concentrations croissantes de la molécule antirétrovirale, sur des lymphocytes d'un donneur sain séronégatif pour le VIH. L'inhibition de la réPLICATION virale est évaluée après 5 à 10 jours de culture sur la diminution, dans le surnageant des cultures, de la production d'antigène p24 viral ou de l'activité transcriptase inverse (**Damond et Decamps, 1998**). La durée pour la réalisation de ces tests est assez longue (3 à 4 semaines) et leur coût est très élevé. Ceci constitue des limites pour ces tests qui ont conduit à la conception de nouveaux tests phénotypiques utilisant des virus recombinants. Les tests utilisant des virus recombinants ont été décrits pour la première fois par Kellam et larder en 1994 au Royaume Uni. Ces tests ont l'avantage d'une courte durée de réalisation (moins de trois semaines) et non sélectifs à la population non représentative pendant les cultures (**Kellam et Larder, 1994**). Ils sont similaires aux tests génotypiques par l'utilisation de virions isolés à partir du plasma. L'ADNc de la zone d'intérêt, généralement la partie du gène *pol* codant pour la protéase et la transcriptase inverse, est amplifié puis inséré dans un virus non infectieux, dont la région codante correspondante a été enlevée. Une intégration de ce matériel dans les cellules réceptrices conduit à une recombinaison homologue, produisant un virus infectieux dont la transcriptase inverse et/ou la protéase proviennent du virus du patient. Les mesures de CI_{50} et CI_{90} s'effectuent ensuite en cultivant le virus recombinant en

présence de plusieurs concentrations d'antirétroviraux, sur des systèmes de cultures cellulaires divers. Ce processus permet de raccourcir d'environ une semaine la durée du test qui reste encore long à réaliser (**Diamond et Decamps, 1998**). Classiquement, la concentration inhibitrice 50% est déterminée pour un panel d'ARV. La résistance est mesurée comme le taux de modification du CI₅₀, calculé en comparant la CI₅₀ du virus recombinant du "patient" avec le CI₅₀ d'une souche de laboratoire. Les seuils cliniques sont basés sur le taux de modification associé à la suppression de la réPLICATION virale dans les études cliniques (www.monogrambio.com). Trois tests phénotypiques commerciaux sont disponibles : Antivirogram® (Virco, Mechelem), PhenoSense® (Monogram, Biosciences) et Phenoscript® (Viralliance) (**Bigaillon et coll., 2010**).

L'Antivirogram® (Virco, Mechelem), repose sur ce qu'on appelle le phénotype «virtuel» qui n'est rien d'autre qu'une interprétation du génotype. Le phénotype est «estimé» à partir des données du génotypage à partir d'isolat d'un patient, apparié à des génotypes semblables pour lesquels les phénotypes sont connus et enregistrés dans une base de données. Les résultats du phénotype virtuel sont rendus comme une estimation calculée d'un phénotype théorique. Cette interprétation, proposée par la firme Virco, pose les mêmes problèmes d'interprétation que le phénotype réel, en particulier pour les INTIs, et est inapplicable aux nouvelles molécules (**Bigaillon et coll., 2010**). De plus, sa fiabilité peut être mise en doute quand le profil génotypique est rare, avec pour conséquence un faible nombre de phénotypes correspondants analysables dans la base de données, ce qui fait qu'il n'est pas recommandé dans la pratique clinique (**Hales et coll., 2006**).

Le PhenoSense® (Monogram, Biosciences) détermine la «capacité de réPLICATION» qui se traduit par le taux de la réPLICATION virale *in vitro* en l'absence d'antirétroviraux. Une étude a démontré que le PhenoSense était plus sensible que l'Antivirogram dans la détection des mutations de résistance à l'abacavir, la didanosine et la stavudine et il n'y avait pas de différences entre les deux tests pour la détection des mutations de résistance aux IPs et INNTIs (**Zhang et coll., 2005**). Le coefficient de corrélation est assez faible si nous comparons l'Antivirogram au PhenoSense (0,36) (**Wang et coll., 2004**).

Le Phenoscript® (Viralliance) ou la détermination du tropisme viral CCR5 (R5) ou CXCR4 (R4) est un préalable impératif avant l'administration d'inhibiteurs de CCR5. Ce test a les mêmes limites que les tests phénotypiques pour la détection des mutations de résistance car il nécessite une charge virale supérieure à 1000 copies/ml et il ne permet pas de différencier les souches ayant un double tropisme R5/X4 d'un mélange de deux populations distinctes. Leur

coût et leur durée de réalisation réduite font que la détermination du tropisme par génotypage de la boucle V3 de la gp120 et par l'utilisation d'algorithmes génotypiques est de plus en plus utilisée. Le génotypage a une concordance de 74 à 81 % avec les tests phénotypiques mais ne permet pas non plus de différencier les virus X4 des virus mixtes (**Bigaillon C et coll., 2010**). Une bonne précision et une reproductibilité de ces tests ont été démontrées dans la caractérisation du tropisme aussi bien pour les CCR5 que pour les CXCR4 (**Whitcomb et coll., 2007**).

Un nouveau paramètre aussi utilisé depuis l'instauration de la classe des IPs, est la détermination du Quotient d'Inhibition Génotypique (QIG). Le QIG permet de moduler la concentration plasmatique des IPs en fonction de leur faible barrière génétique. Le QIG est le rapport de la concentration plasmatique résiduelle de l'IP par rapport au nombre de mutations associées à une résistance à l'IP. Il serait plus prédictif de la réponse virologique que le sont, séparément, les paramètres qui servent à le calculer. Il n'est pas actuellement utilisé en routine du fait d'un manque de standardisation (**Bigaillon et coll., 2010**).

L'importance des tests phénotypiques a été notée dans la caractérisation des mutations de résistance et leur impact sur la sensibilité du VIH aux molécules antirétrovirales. C'est ainsi qu'il a été démontré que les mutations : N348I, T369V et A371V au niveau de la région C-terminale de la TI, entraînent une diminution de la sensibilité du VIH-1 à la zidovudine et une résistance à la nevirapine, en association avec les TAMS de type I et/ou de type II (**Lengruber et coll., 2011**).



DEUXIEME PARTIE :

ANALYSE DES

TRAVAUX

DEUXIEME PARTIE : ANALYSE DES TRAVAUX

Les résultats de nos travaux de recherche sont issus de la collaboration Nord-Sud entre l'Unité Mixte Internationale de recherche (UMI 233) à l'IRD de Montpellier et le laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec et aussi entre le dit laboratoire et les différents sites cliniques de la région de Dakar.

I. Contexte et justificatif de l'étude

I.1. Contexte

Le Sénégal est un pays situé à l'ouest de l'Afrique au Sud du Sahara, limité au nord par la Mauritanie, au sud par la République de Guinée et la Guinée Bissau, à l'Est par le Mali et à l'Ouest par l'océan Atlantique. Le territoire sénégalais est compris entre 12°8 et 16°41 de latitude nord et 11°21 et 17°32 de longitude Ouest.

Le Sénégal compte 14 régions, 45 départements, 46 communes d'arrondissement, 113 communes de ville et 370 communautés rurales (http://www.cnls-senegal.org/pdf/PSN_2011-2015.pdf)

Le pays s'étend sur 196 722 km² et sa population est estimée à 12.969.606 millions (estimation de Juillet 2011) avec une densité de 64 habitants au kilomètre carré et une croissance démographique annuelle de 2,53%. Une répartition de cette population selon l'âge donne les proportions suivantes : 43,3% ont moins de 15 ans, 53,9% pour la tranche d'âge comprise entre 15 et 64 ans et enfin, 2,9% pour ceux ayant plus de 65 ans. Les taux de natalité et de mortalité sont respectivement : 36,19 naissances pour 1.000 habitants et 9,05 décès/1.000 habitants (http://www.indexmundi.com/fr/senegal/population_profil.html).

Le système de santé du Sénégal se présente sous forme de pyramide à 3 niveaux. Il est composé des structures publiques suivantes : 25 hôpitaux dont 23 fonctionnels, 76 districts sanitaires, 89 centres de santé, 1.240 postes de santé, 129 maternités, 2.098 cases de santé, 06 établissements publics de santé non hospitaliers. Outre ces structures publiques, le système de santé sénégalais comprend 555 cabinets médicaux privés, 37 cliniques privées, 570 cabinets para médicaux privés, 23 structures d'entreprise et 77 postes de santé privés. Cependant, en termes de couverture en infrastructures sanitaires, le Sénégal n'a pas encore atteint les normes préconisées par l'OMS (http://www.cnls-senegal.org/pdf/PSN_2011-2015.pdf). Il y a un centre de santé pour 165.878 habitants, ce qui est largement supérieur à la norme de l'OMS qui recommande 1 centre de santé pour 50.000 habitants). (<http://www.keewu.com/article320.html>).

Les données épidémiologiques sur l'infection à VIH au Sénégal ont été documentées grâce à l'existence d'un programme de surveillance sentinelle couvrant plusieurs sites dans le pays depuis 1989. Ce programme a pour mission d'établir les prévalences annuelles de l'infection à VIH et de la syphilis, mais aussi de donner les tendances évolutives et de faire des estimations en ciblant les populations clés. Ce programme a permis de caractériser le Sénégal comme pays à épidémie concentrée avec une prévalence faible (0,7%) dans la population générale, mais élevée dans les populations clés que sont les professionnelles du sexe (18,5%), les HSH (21,8%) et les injecteurs de drogues intraveineuses (9,2%) (<http://www.orlysoft.com/sites/rars/images/stories/Bulletin14.pdf>).

I.2. Justificatif

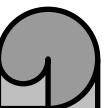
Depuis 1998, le Sénégal fut l'un des premiers pays africains à disposer d'une initiative gouvernementale d'accès aux ARV dénommée ISAARV (**Desclaux et coll., 2002**). En 2012, 18 352 patients sont sous traitement hautement actif (HAART) ([http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report[1].pdf)).

Des études prospectives ont montré un bon suivi thérapeutique des premiers patients sous HAART de 1^{ère} ligne dans les pays à ressources limitées (**Weidle et coll., 2002 ; Laurent et coll., 2005 ; Etard et coll., 2006 ; Braitstein et coll., 2006**). Cependant, le nombre insuffisant de laboratoires pour le suivi virologique, les propriétés intrinsèques du virus (taux élevé de multiplication et grande variabilité génétique) et les facteurs liés au traitement antirétroviral (tolérance, toxicité et interactions médicamenteuses) compromettent le succès thérapeutique à long terme (**keiser et coll., 2009 ; keiser et coll., 2011**). L'étude des conséquences du traitement ARV à long terme à travers le projet ANRS 1215, cohorte de patients sous HAART pendant plus de 10 ans, contribuera à une meilleure appréciation les programmes d'accès aux ARV dans les pays à ressources limitées comme le Sénégal. Pour pallier ce déficit de suivi virologique, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) autorise, dans une approche de santé publique, un changement de ligne thérapeutique en utilisant seulement les paramètres cliniques ou immunologiques lorsque la charge virale plasmatique n'est pas disponible (<http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/>). Cependant, des études ont démontré qu'en se basant sur ces recommandations, on est confronté à un nombre élevé de patients porteurs de virus résistants aux molécules antirétrovirales (**Kantor et coll., 2004 ; Cozzi-Lepri et coll., 2009**) et une forte accumulation de mutations de résistance dénommées TAMs (Thymidine Analog Mutations) (**Hosseinipour et coll., 2009**). Au Sénégal, les

données disponibles en termes de résistance du VIH-1 aux ARV proviennent d'études prospectives utilisant des conditions standards de suivi virologique (**Laurent et coll., 2002** ; **Laurent et coll., 2005** ; **Wallis et coll., 2009**). Cependant, nous n'avons pas de données sur un certain nombre de patients sous HAART et suivis selon l'approche santé publique avec les recommandations de l'OMS. Documenter la prévalence des mutations de résistance et la diversité génétique chez les patients suivis selon l'approche santé publique au Sénégal, serait essentiel pour mieux comprendre l'importance des paramètres virologiques dans la prise en charge thérapeutique de ces patients. L'étude de la résistance du VIH-1 aux molécules antirétrovirales avec le programme de l'ISAARV a commencé depuis 2003 avec différentes techniques, qui ont été développées sur les VIH-1 de sous-type B (**Chen et coll., 2007**). A partir de 2009, le laboratoire de Bactériologie Virologie de l'hôpital CHU Le Dantec, a été accrédité par l'OMS comme étant le laboratoire de référence dans le monitoring de la résistance aux ARV, utilisant la technique commerciale d'Applied Biosystems, le ViroSeq HIV-1 Genotyping System V2.0 (Celera, Alameda, CA, USA). L'utilisation de cette technique sur des souches de VIH-1 non-B est souvent confrontée à des échecs d'amplification et/ou de séquençage, ce qui oblige souvent à effectuer des reprises ou d'utiliser une technique alternative pour générer un rapport de résistance. L'analyse des performances de cette technique sur des souches de VIH-1 non-B serait indispensable dans la maîtrise des paramètres virologiques de suivi des patients infectés par le VIH-1 au Sénégal. La thérapeutique antirétrovirale (TARV) à long terme non efficace, due à une mauvaise observance ou à l'acquisition de souches résistantes, peut favoriser la survenue de surinfections (**Blackard et Mayer, 2004**). La surinfection est souvent documentée chez les populations clés, mais aussi chez les couples séroconcordants qui pratiquent des rapports sexuels non protégés. Les conséquences de la surinfection deviennent plus graves si elle implique des virus résistants, avec la formation d'un recombinant multi-résistant (**Blick et coll., 2007**). La cohorte de l'ANRS 1215 est constituée de patients sous HAART pendant plus de 10 ans dont certains forment des couples séroconcordants. Cette cohorte a fait l'objet de la documentation d'un cas de surinfection, dont les conséquences pourront avoir un impact sur le suivi virologique et thérapeutique des patients, la diversité génétique et la progression de la maladie (**Blackard et coll., 2002**).

L'ensemble des ces interrogations ont fait l'objet d'études et de publications scientifiques suivantes :

- Evaluation de la réponse virologique et de la survenue de résistances du VIH-1 aux ARV après 10 ans de traitement ARV au Sénégal, cohorte ANRS 1215 (article 1),
- Détermination de la prévalence des mutations de résistance aux ARV et la variabilité génétique du VIH-1 chez une population sous ARV et suivie selon l'approche santé publique de l'OMS au Sénégal (article 2),
- Evaluation des performances d'une technique génotypique face à la variabilité génétique des souches de VIH-1 qui circulent au Sénégal : le ViroSeq HIV-1 Geneotyping System V2.0 (article 3),
- Documentation d'un cas de surinfection, qui est une des conséquences d'un traitement ARV sous-optimal dans le long terme (communication affichée).



Article 1 :

De Beaudrap P, **Thiam M**, Diouf A, Toure-Kane C, Ngom-Guèye NF, Vidal N, Mboup S, Ndoye I, Sow PS, Delaporte E, for the ANRS 1215 study group. **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.* 2013, 62 (4): 381-87

II. Publications scientifiques

II.1. Evaluation de la réponse virologique et de la survenue de résistance du VIH-1 aux ARV après 10 ans de traitement ARV au Sénégal, cohorte ANRS 1215

II.1.1. Problématique

Le Sénégal fut l'un des premiers pays africains à disposer, depuis 1998, d'une initiative gouvernementale d'accès aux ARV, dénommée ISAARV et les patients sont sous traitement hautement actif, Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) (**Desclaux et coll., 2002**). Des études prospectives ont montré un bon suivi thérapeutique des premiers patients sous HAART de 1^{ère} ligne dans les pays à ressources limitées (**Weidle et coll., 2002 ; Etard et coll., 2006 ; Braitstein et coll., 2006**). Cependant, les données sur la réponse virologique et la réponse au traitement ARV chez les patients sous HAART de 2^{nde} ligne sont rarement documentées au Sénégal.

II.1.2. Objectif

L'objectif de cette étude consistait à analyser les résultats virologiques à long terme chez les patients sous 1^{ière} ligne et la réponse au traitement ARV chez des patients sous HAART de 2^{nde} ligne dans la cohorte observationnelle de l'ANRS 1215.

II.1.3. Méthodologie

➤ Population d'étude :

La cohorte ANRS 1215 était composée de 444 patients infectés par le VIH-1 et ayant débuté un traitement ARV entre Aout 1998 et Décembre 2004 puis suivis jusqu'en Juin 2010. Les patients inclus dans cette analyse sont :

- ceux sous ARV avec 2INTI + 1INNTI ou bien 2INTI + 1IP,
- suivis pour au moins pendant six mois avec, à la limite une valeur de charge virale (CV) en plus de celle à l'inclusion.

Un suivi clinique a été effectué tous les deux mois et un suivi biologique comprenant la numération des CD4 et la détermination de la CV, tous les six mois.

➤ Définition :

Le succès virologique initial a été défini comme une CV inférieure à 500 copies/ml et l'échec virologique comme deux mesures successives de la CV supérieures à 1000 copies/ml après un

succès virologique. A défaut d'un deuxième point de CV, une seule valeur de CV supérieure à 1000 copies/ml et accompagnée d'un échec immunologique (taux de CD4 toujours inférieur à 100 cellules/mm³ ou une réduction de 50% du taux d'origine) ou une seule valeur de CV supérieure à 5000 copies/ml, est considérée comme un échec virologique. Un rebond virologique a été défini comme une CV supérieure à 1000 copies/ml sans les autres critères d'échec cités ci-dessus. Un changement majeur de traitement a été défini comme l'utilisation d'une nouvelle association d'ARV contenant au moins deux molécules ou une nouvelle classe. L'observance a été estimée à partir du rapport entre le nombre de comprimés utilisés sur le nombre de comprimés remis. Le niveau d'observance moyen a été calculé comme la moyenne de l'observance estimée à chaque visite à la pharmacie entre la mise sous ARV et le premier évènement (échec virologique, décès ou changement de traitement).

➤ Analyses biologiques

La charge virale plasmatique a été initialement mesurée à l'aide du test Bayer bDNA HIV-1 Quantiplex (Bayer Diagnostics, Emeryville, California, USA) version 2.0, puis à l'aide du test Amplicor HIV-1 1.5 ou 2.0 (Roche Molecular Systems, France). Le taux de lymphocytes T CD4 a été mesuré avec le FACSCount (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA). Les tests génotypiques de résistance aux ARV ont été réalisés lorsque la charge virale était supérieure à 1000 copies/ml à l'aide de la technique développée par Vergne et collaborateurs **Vergne et coll., 2000 ; Djoko et coll., 2011**). Les résistances mineures et majeures ont été déterminées avec la dernière version de la base de données de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). Les tests ont ensuite été interprétés à l'aide de l'algorithme de l'ANRS version V2011.05.

➤ Analyses statistiques

Les critères statistiques considérés dans l'analyse des données ont été :

- la probabilité de succès virologique,
- la probabilité d'échec virologique,
- la réponse immunologique en fonction de la réponse virologique,
- la proportion de résistances aux ARV et les profils de résistance trouvés chez les patients en échec virologique,
- la probabilité de changement de traitement et la réponse immunologique et virologique sous traitement ARV de seconde ligne.

La proportion de patients avec résistance aux ARV a été calculée à partir des tests de résistance disponibles dans une fenêtre de 6 mois à 12 mois après l'échec virologique (**Gupta**

et coll., 2009). Il a été fait l'hypothèse que, les patients sans échec virologique n'avaient pas de résistance. Même si le résultat d'un test de résistance au moment de l'échec n'était disponible que pour deux tiers des patients en échec virologique, l'ensemble de la population d'étude a été incluse dans l'analyse afin d'éviter un biais de sélection grâce à l'imputation multiple des données manquantes (**Little et Rubin, 2002** ; **Abraham et coll., 2011**). Par ailleurs, les mesures de la charge virale et les tests de résistances n'ont été réalisés que de façon intermittente et étaient, par conséquent, censurés par intervalle. Aussi, les probabilités cumulées de succès virologique, d'échec et de résistance ont été estimées à l'aide d'une méthode non paramétrique basée sur l'algorithme de Turnbull (**Turnbull, 1976**). Les caractéristiques des patients à l'inclusion (sex, âge, stade clinique, nombre de lymphocytes T CD4, charge virale), le type de traitement ARV reçu (contenant un IP ou un INNRT) et le niveau moyen d'observance ont été considérés comme des facteurs prédictifs potentiels de la réponse virologique. L'association entre ces variables et la survenue d'un échec virologique ou d'une résistance a été évaluée à l'aide de modèles linéaires généralisés comme décrit par Farrington et Carstensen (**Carstensen, 1996** ; **Farrington, 1996**). Les intervalles de confiance à 95% (IC 95%) ont été estimés par bootstrap (**Efron et Tibshirano, 1993**). L'évolution des CD4 au cours du temps a été modélisée à l'aide d'un modèle non linéaire à effets. L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel R (www.R-project.org).

II.1.4. Résultats

➤ **Caractéristiques des patients**

Le tableau VII ci-dessous montre les caractéristiques des 366 patients qui répondaient aux critères d'inclusion parmi les 444 suivis. Un nombre de 78 patients était exclus dans l'analyse, comprenant 18 patients recevant une bithérapie, 48 patients suivis pendant moins de six mois et 12 patients sans CV après la mise sous ARV.

Tableau VII : Caractéristiques de la population d'étude à l'inclusion (N=366)

Femme, n (%)	206 (56)	
Age, médiane (IIQ)	38 (31 - 44)	
Charge virale (log), médiane (IIQ)	5.2 (4.7 – 5.6)	n = 304
SIDA, n (%)	191 (52)	
Lymphocytes CD4, médiane (IIQ)	135 (58 – 223)	n = 356
Traitements ARV de première ligne		
	IP	INNRT
3TC + AZT	48 (13)	69 (19)
3TC + D4T	13 (3)	13 (3)
3TC + DDI	10 (3)	66 (18)
AZT + DDI	3 (1)	-
D4T + DDI	64 (17)	45 (12)
TDF + FTC	-	35 (10)

IIQ : Intervalle Interquartile ; ARV : antiretroviral ; IP : inhibiteur de la protéase ; INNRT : inhibiteur non nucléosidique de la réverse transcriptase ;

Les patients ont été suivis sous HAART de 1^{ère} ligne pour une médiane de 69 mois. Les patients sous schéma thérapeutique avec les INNTIs sont plus fréquents (n=228, 62%) que ceux avec un IP non boosté (n=138, 38%). Comparés aux patients recevant un INNTI, ceux sous IP ont été inclus plus tôt, avant 2001 et avaient un nombre de CD4 plus bas ($p<0,001$).

➤ Probabilité cumulée chez les 366 patients

La figure 28 ci-dessous montre la probabilité cumulée chez les 366 patients en termes de succès virologique initial (1), échec virologique (2), résistance (3) et changement de traitement (4).

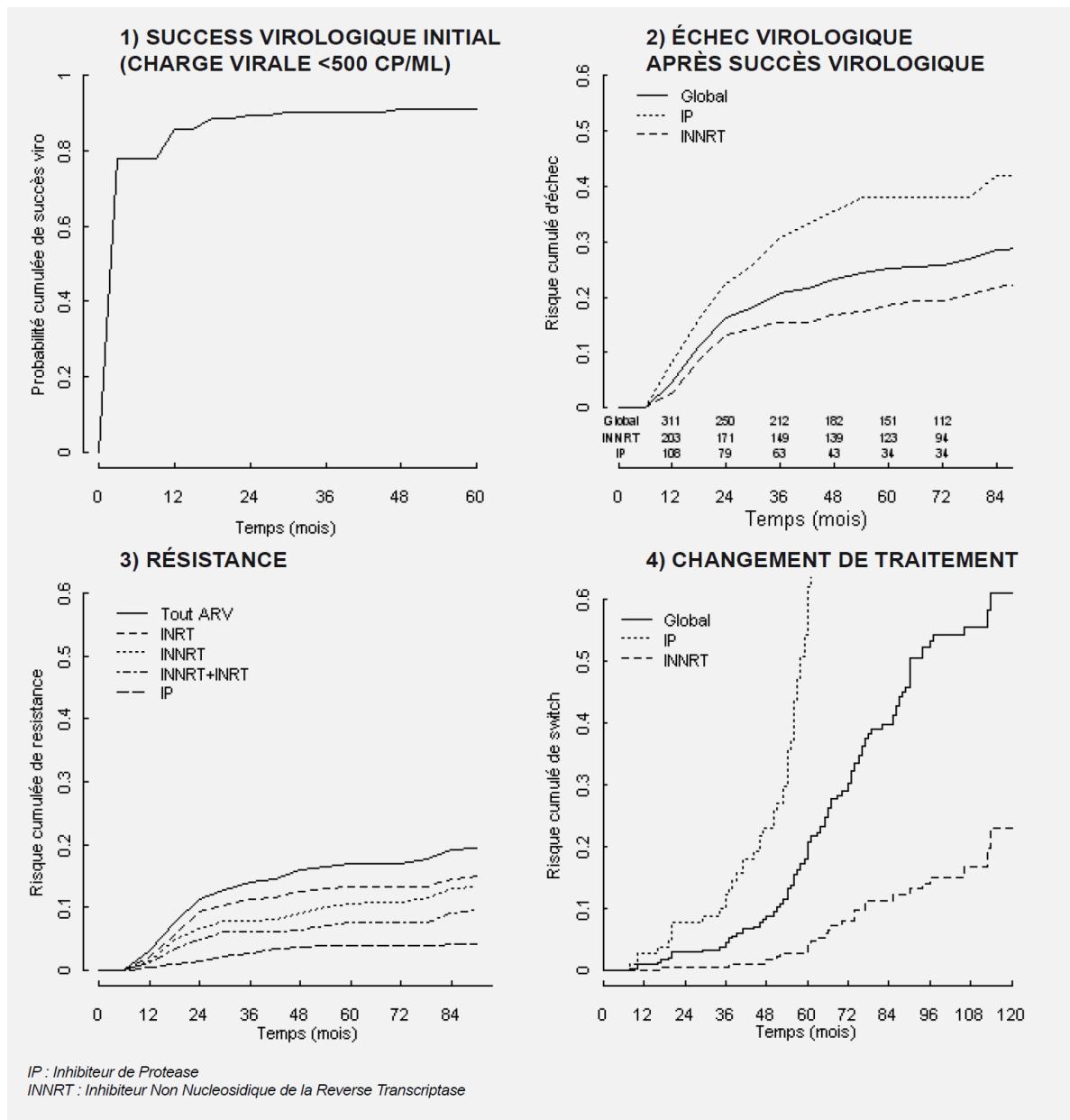


Figure 28 : La probabilité cumulée chez les 366 patients en termes de : 1) succès virologique initial, 2) échec virologique, 3) résistance et 4) changement de traitement

- 1) Un succès virologique initial a été observé chez 324 patients, soit 89%. La probabilité cumulée d'obtenir une CV<500 copies/ml à 3, 6, 12 et 24 mois était respectivement de 78% [74-82], 78% [74-82], 86% [83-89] et 89% [86-92].
- 2) Parmi les 324 patients ayant obtenu un succès virologique initial, 127 (39%) ont eu un simple rebond durant leur suivi et 79 (24%) un échec virologique. La probabilité cumulée d'échec à 12, 24 et 60 mois était respectivement de 5% [3-7], 16% [13-20] et 25% [21-30].
- 3) La probabilité cumulée de résistance était de 3% [1-5] à 12 mois, 12% [8-15] à 24 mois, 16% [13-21] à 48 mois et 18% [13-21] à 72 mois.

4) Durant le suivi, 129 changements majeurs de traitement ont été observés, soit une probabilité cumulée de changement de 3,5% [2,0 - 5,9] à 12 mois, 5,8% [3,8 - 8,8] à 24 mois, 11,8% [8,8 - 15,8] à 48 mois et 30,8% [25,9 - 36,5] à 72 mois. La probabilité de changement de traitement était plus élevée chez les patients recevant une IP (8,21, [5,28-12,77]. Seuls 52 (60%) patients en échec virologique ont eu un changement de traitement, et ceci après un délai médian de 36 mois [18-54]. Ce délai entre l'échec virologique et le changement de traitement était significativement plus important pour les premiers patients inclus dans la cohorte ($p<0.001$).

➤ Réponse immunologique

La dynamique des lymphocytes T CD4, figure 29, a été modélisée à l'aide de la technique d'Ornstein-Uhlenbeck.

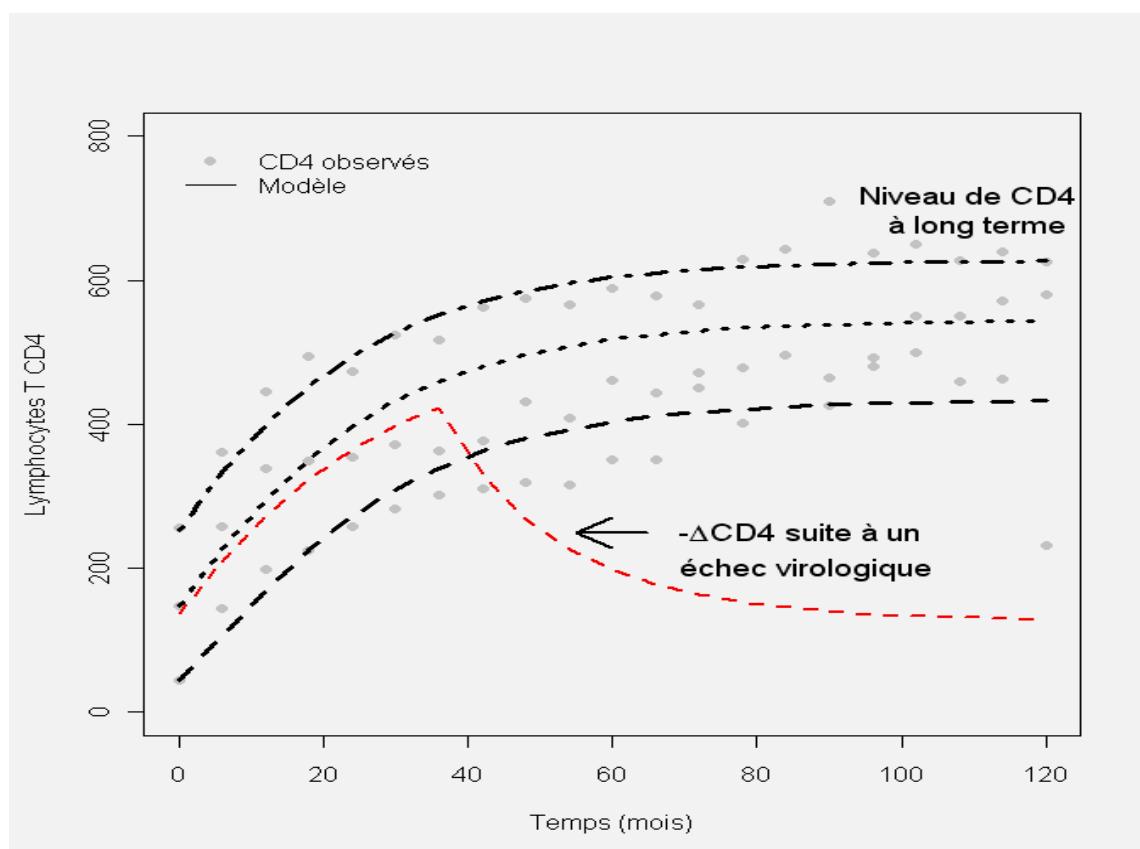


Figure 29 : Modélisation de la dynamique du taux de lymphocytes T CD4 après la mise sous traitement ARV

Les valeurs observées en médiane par intervalles de 6 mois sont représentées en points gris et les valeurs modélisées en tirets noirs pour les patients avec un taux de CD4 <100 cellules/mm³, compris entre 100-200 cellules/mm³ et supérieur à 200 cellules/mm³ à

l'inclusion. La courbe rouge indique la trajectoire simulée pour un patient présentant un échec virologique persistant après 36 mois de traitement ARV.

Le modèle indique que le taux moyen de lymphocytes T CD4 chez les patients avec un succès virologique, a augmenté entre la mise sous traitement et le plateau à long terme, de 138 [125-150] à 543 [513-577] cellules/mm³.

➤ Relation entre l'échec virologique, la résistance et l'observance

Une relation entre la probabilité cumulée de l'échec virologique, de la résistance et de l'observance est représentée par la figure 30 ci-dessous.

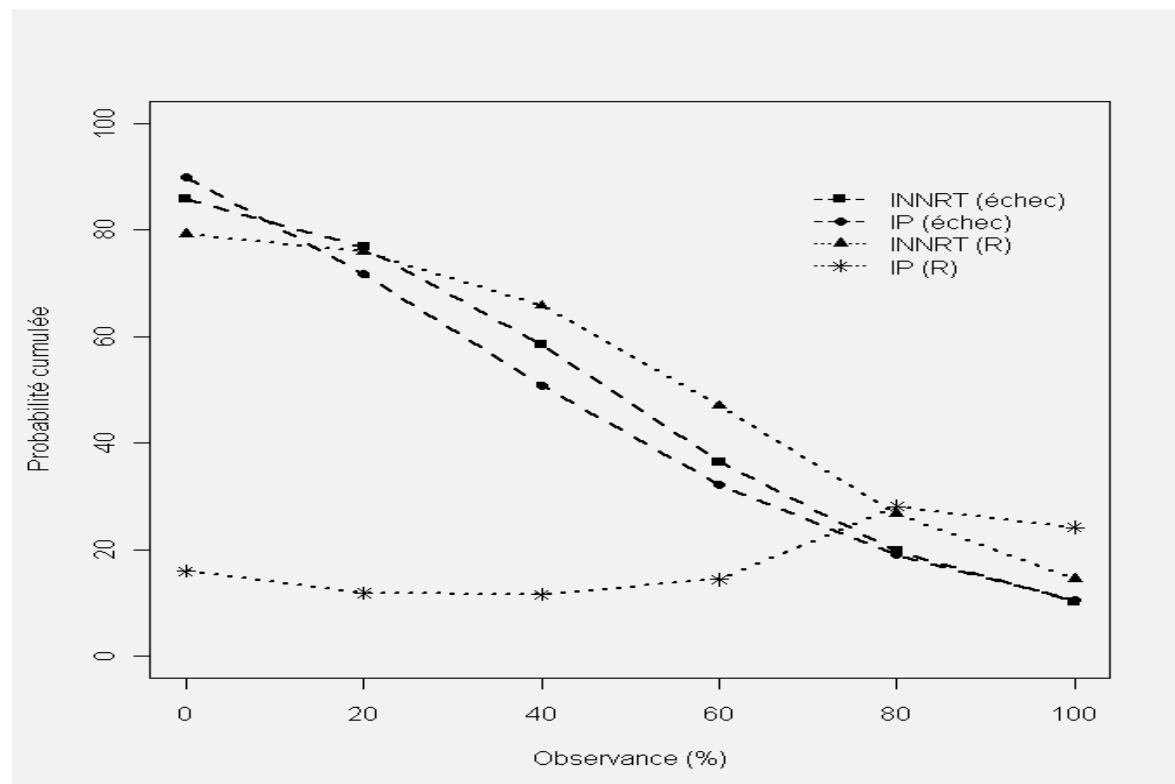


Figure 30 : Relation entre la probabilité cumulée d'échec virologique, de résistance et d'observance (par catégorie de traitement ARV)

La figure montre que la relation entre l'observance et le risque d'échec virologique d'une part et entre l'observance et le risque de résistance d'autre part, était non linéaire.

➤ Résistance chez les patients en échec virologique

La fréquence des mutations de résistance aux différentes molécules antirétrovirales, chez les patients en échec virologique, est représentée dans la figure 31 ci-dessous.

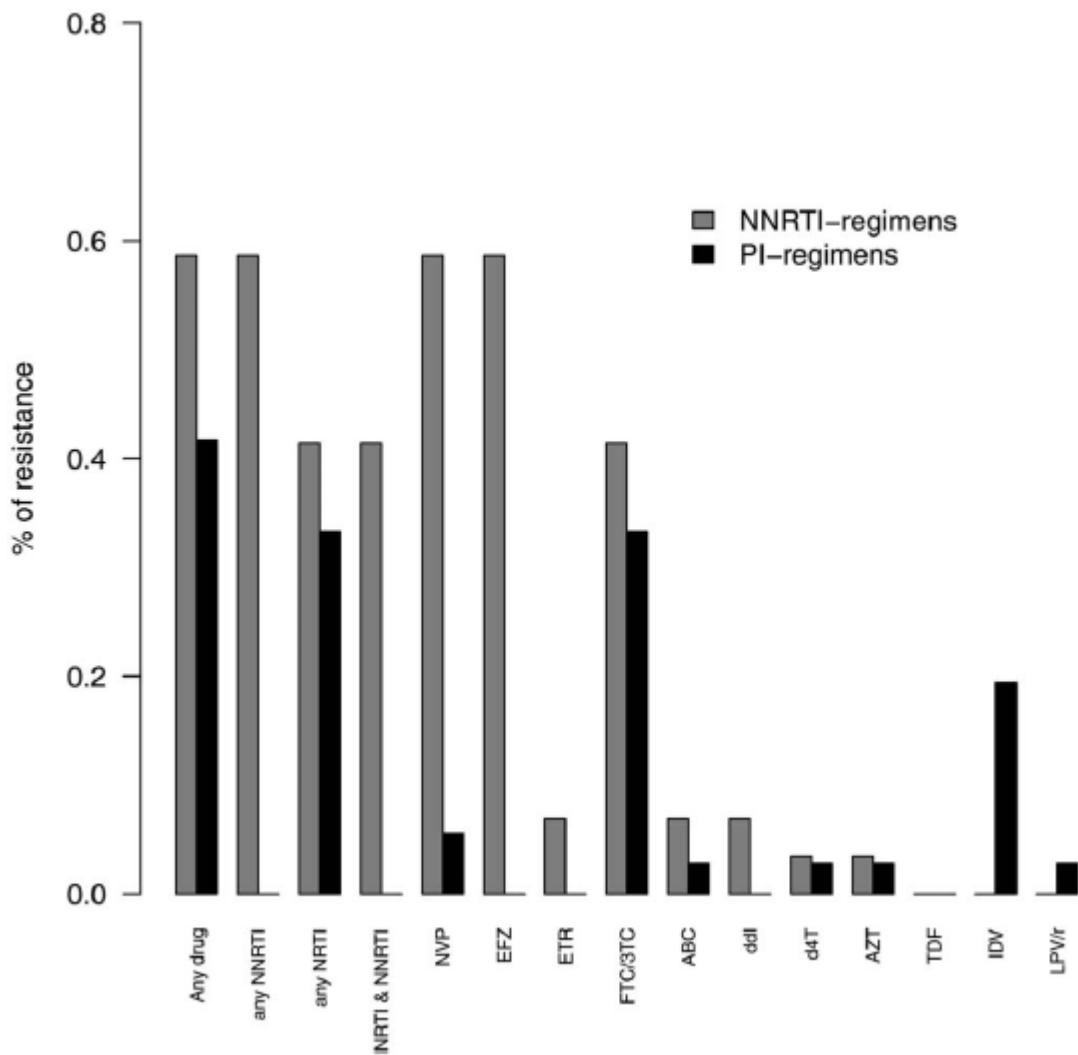


Figure 31 : Fréquences des principales résistances aux différents ARV chez les patients en échec virologique

Parmi les patients ayant eu un échec virologique, 48 (60%) ont eu un test de résistance avant la mise sous traitement, et une seule mutation de résistance à lamuvidine (3TC) a été observée. Un résultat de test de résistance était disponible pour 53 (67%) patients dont 22 recevant un INNRT et 31 un IP. Trente deux patients (60%) avaient au moins une mutation de résistance et 21 (40%) avaient une résistance à deux classes d'ARV. Dix sept mutations de résistance à l'INNRT (77%) et 7 mutations de résistance à l'IP (23%) ont été observées parmi les patients recevant ces molécules. La mutation de résistante aux INRT la plus fréquente était la mutation M184V (n=24, 45%).

II.1.5. Conclusion

Les données issues des premiers patients infectés par le VIH-1 avec un traitement hautement actif (HAART), nous ont permis d'analyser les aspects virologiques chez des patients sous 1^{ière} ligne de traitement ARV pendant plus de cinq ans et la réponse virologique pour ceux en 2^{nde} ligne. Cette étude a démontré un succès virologique chez les patients en 1^{ière} ligne avec 80%. Cependant, le délai existant entre le moment de l'échec virologique et le changement de ligne thérapeutique, fait que les mutations de résistance deviennent plus fréquentes ensuite. L'échec virologique durant la mise sous ARV de 2^{nde} ligne apparaît très tôt après le changement de ligne thérapeutique. L'échec virologique chez les patients en 2^{nde} ligne montre la nécessité de disposer d'un schéma thérapeutique de troisième ligne dans les pays à ressources limitées. Cette étude est la première dans les pays à ressources limitées, à documenter le taux d'échec virologique et le développement de mutations de résistance pour des patients suivis sur une longue durée. Elle donne des résultats chez les patients avec un suivi standardisé dans le projet de l'ANRS 1215. A coté de ces patients à suivi structuré, il y'a des patients suivis selon l'approche santé publique, c'est-à-dire sans un accompagnement rapproché, mais ces patients bénéficient aussi gratuitement, tous les six mois, d'une numération du taux de CD4 et de la détermination de la CV. Chez ces derniers, des échecs de TARV ont été reportés (**Kantor et coll., 2004 ; Cozzi-Lepri et coll., 2009**). Le travail présenté dans l'article suivant avait comme objectif d'étudier les caractéristiques de la résistance aux ARV dans ce groupe.

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

Pierre De Beaudrap, MD, PhD,* Moussa Thiam, PhD,† Assane Diouf, MD, MPH,‡
 Coumba Toure-Kane, PhD,† Ndéye F. Ngom-Guèye, MD,§|| Nicole Vidal, PhD, *
 Souleymane Mboup, PhD,† Ibrahim Ndoye, MD,‡ Papa S. Sow, MD,‡
 and Eric Delaporte, MD, PhD, *for the ANRS 1215 Study Group

Background: In 1998, Senegal launched one of Africa's first antiretroviral therapy (ART) programs. Since then, the number of treated patients in Africa has substantially increased thanks to simplification in treatment management. Although good outcomes over the first years of ART have been observed in sub-Saharan Africa, little is known about the long-term (>5 years) risks of virological failure and drug resistance and about second-line treatment response.

Methods: Patients from the ANRS-1215 cohort in Senegal, started with either one nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor or indinavir, a first-generation nonboosted protease inhibitor, followed for >6 months and having >1 viral load (VL) measurement were included. Virological failure was defined as 2 consecutive VL measurements >1000 copies/mL.

Results: Of the 366 patients included, 89% achieved a VL <500 copies/mL. The risk of virological failure at 12, 24, and 60 months was 5%, 16%, and 25%, being higher in younger patients ($P = 0.05$), those receiving a protease inhibitor-containing regimen ($P = 0.05$), and those with lower adherence ($P = 0.03$). The risk of resistance to any drug at 12, 24, and 60 months was 3%, 11%, and 18%. After virological failure, 60% of the patients were switched to second-line treatments. Although 81% of the patients achieved virological success, the risk of virological failure was 27% at 24 months, mostly in patients with multiple resistances.

Conclusions: In this cohort, virological outcomes for first-line treatments were good compared with those from high-resource settings. However, the rate of virological failure for second-line treatment was high, probably because of accumulation of resistances.

Key Words: HIV, antiretroviral therapy, virological response, drug resistance, sub-Saharan Africa

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:381–387)

INTRODUCTION

In 1998, Senegal was one of the first African countries to launch a national antiretroviral treatment program, the Senegalese Initiative for Antiretroviral Access (ISAARV).¹ Since then, highly active antiretroviral therapy (HAART) has been rolled out all over African countries,^{2–4} and a substantial increase in the number of HIV-infected patients treated has been observed.⁵ Although good outcomes over the first years of HAART have been reported in low-resource settings,^{3,6,7} limited access to laboratory monitoring, the use of poorly tolerated antiretroviral combinations, and the numerous logistical challenges to treatment delivery may compromise long-term outcomes.^{8–10} Further evidence to justify this concern is therefore of utmost importance. However, data on the long-term virological outcomes and on the response to second-line HAART in resource-limited settings are scarce.

An observational research cohort (ANRS 1215) was started in Senegal with the first patients included in the ISAARV to assess the feasibility, acceptability, and effectiveness of starting an ART.² In this study, we aimed to analyze long-term virological outcomes and responses to second-line HAART treatment.

METHODS

Study Population

The source population consisted of 444 HIV-1 infected adults enrolled between August 1998 and December 2004 and followed up until June 2010. Study design and inclusion criteria have been previously reported in detail.^{2,6,11–13} Patients were included in this analysis if (1) they had been started with an ART regimen containing 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and either one first-generation nonboosted

Received for publication July 5, 2012; accepted October 19, 2012.
 From the *UMI 233, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université de Montpellier 1, Montpellier, France; †Laboratoire de Biostatistique-Virologie, Hôpital Le Dantec, Dakar, Sénégal; ‡Multisectorial AIDS Program, Dakar, Senegal; §Centre Régional de Recherche et Formation sur le VIH/SIDA, Université Cheikh Anta Diop (UCAD), UMI 233, Dakar, Sénégal; and ||Centre de Initiation ambulatoire, CHU de Fann, Dakar, Sénégal.

Supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) (Projects 1215 and 1290), the European Union (Project B7-6211/99/005), the Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the full text and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.jaids.com).

Correspondence to: Pierre De Beaudrap, UMI 233 "TransVIHMI," Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 05, France (e-mail: pierre.debeaudrap@ird.fr).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 62, Number 4, April 1, 2013

www.jaids.com | 381

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

protease inhibitor (PI) or one nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), (2) they had been followed up for at least 6 months and had had at least one viral load (VL) measurement after their baseline measurement at cohort inclusion. All patients had a comprehensive clinical and biological evaluation at inclusion. Follow-up with a clinical examination occurred every 2 months and biological evaluations—including CD4-cell count and VL measurements—were performed every 6 months. Other monitoring details have been previously published.^{2,6} The study was approved by the Senegalese National Committee for Health Research.

Definitions

Virological success and failure were defined, respectively, as a patient achieving a VL <500 copies/mL and 2 consecutive VLs ≥1000 copies/mL after achieving initial virological success.¹⁴ When the second VL measurement was unavailable, the following criteria were used to define virological failure: one VL measurement ≥1000 copies/mL along with documented immunologic failure (fall in CD4-cell count below pre-ART level or ≥50% decrease) or one VL measurement ≥5000 copies/mL. An alternative definition of virological failure as any VL ≥1000 copies/mL was also considered in this analysis to assess the sensitivity of the results to the criteria used. Finally, a major treatment switch was defined as initiating a new HAART regimen containing either a new drug class or at least 2 drugs not used in the failed regimen.

Adherence

Pill counts of untaken ARVs returned by patients were performed at each pharmacy visit. Adherence was therefore computed for each different ARV as the ratio of pills actually consumed to the number that had been prescribed between 2 consecutive pharmacy visits. The average adherence level was calculated as the mean adherence for all ARV until virological failure, treatment switch, censoring, or death, whichever came first.

Laboratory Procedures

VL was measured using the Amplicor HIV-1 1.5 or 2.0 assay (Roche Molecular Systems, Meylan, France) or the Bayer bDNA HIV-1 Quantiplex 2.0 or 3.0 assay (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). CD4-cell counts were measured with the FACSCount technique (Becton Dickinson, San Jose, CA). Genotypic drug resistance testing was performed on samples with VL ≥1000 copies/mL, using a previously described in-house assay.¹⁵ Briefly, a *pol* gene fragment spanning the protease and two-thirds of the reverse transcriptase regions was generated by nested polymerase chain reaction and then directly sequenced. HIV-1 subtypes/CRFs were determined by phylogenetic tree and recombination analysis. Amino acid sequences were used to identify minor and major resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes, based on the latest updated online Stanford Resistance Database HIV1g program (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=algSequenceInput>). Mutations were interpreted using the ANRS algorithm version V2011.05, HIVDB algorithm version 6.1.1, and the REGA algorithm version V8.0.2.

Statistical Analysis

The following end points were considered in this analysis: (1) the probability of virological success, (2) the probability of virological failure, (3) the immunologic response in relation to the virological response, (4) the proportion of drug resistance and the resistance pattern among patients with virological failure, (5) the probability of switching to second-line HAART, and (6) virological response after switching to second-line HAART.

For patients who experienced virological failure, results of genotypic drug resistance tests were considered in the analysis if the tests were performed in a window of 6 months before and 12 months after virological failure. It was assumed that patients with virological suppression did not have drug resistance. As results of the resistance tests were available for only two-thirds of the patients with virological failure, a multiple-imputation method was used to estimate the probability of resistance from the full data set.^{16,17} VL and resistance tests were performed intermittently resulting in interval-censored data that were analyzed using the interval censoring framework.¹⁸ The cumulative probabilities of virological success, virological failure, and resistance over time were computed with a nonparametric estimator derived from Turnbull algorithm.¹⁹ A bootstrap resampling procedure was used to compute robust confidence intervals.²⁰ Variables assessed as potential risk factors of virological failure or resistance included those measured at baseline (age, sex, CDC stage, CD4-cell count, and pre-HAART VL), the type of HAART regimen received (PI- or NNRTI-based) and the average adherence level. The relationship between covariates, the occurrence of virological failure and drug resistance, was assessed using generalized linear models.²¹ Nonlinear relationships were modeled using splines with generalized additive model models.²² Immunologic response before and after virological failure was assessed by comparing the CD4-cell count just before and then 6 months after virological failure between patients who experienced virological failure, and control patients matched for follow-up duration, sex, age, baseline clinical stage, and baseline CD4-cell count. All statistical analyses were performed with the open source software R.²³

RESULTS

Study Population

A total of 366 patients were included in the study after excluding the following: 18 patients who were receiving a dual-therapy regimen, 48 patients who had been followed up for <6 months, and 12 patients who had no VL results after baseline. The mortality rate in these excluded patients was high (60%). The median follow-up duration on first-line HAART was 69 months [inter quartile range (IQR) = 42–99]. NNRTI-based regimens were more common than PI-based ones [228 (62%) patients receiving an NNRTI vs. 138 (38%) patients receiving a PI]. Compared with patients started with an NNRTI, those receiving a PI had been enrolled earlier in the cohort (88% of them had been enrolled before 2001 vs. 64% of those receiving an NNRTI, $P < 0.001$) and had lower CD4-cell count ($P < 0.001$). The other characteristics of the study population and the other drugs received are provided in Table 1.

TABLE 1. Study Population Characteristics at Baseline (n = 366), ANRS 1215

	PI	NNRTI
Female, n (%)	206 (56)	
Age, median (IQR)	38 (31–44)	
Log ₁₀ -VL, median (IQR)	5.2 (4.7–5.6)	n = 304
Previous AIDS, n (%)	191 (52)	
CD4, median (IQR)	135 (58–223)	n = 356
First Line Regimen		
3TC + AZT	48 (13)	69 (19)
3TC + d4T	13 (3)	13 (3)
3TC + ddI	10 (3)	66 (18)
AZT + ddI	3 (1)	—
d4T + ddI	64 (17)	45 (12)
TDF + FTC	—	35 (10)

Virological Response

Initial Virological Response

A total of 324 (89%) patients achieved virological success. The probability of virological success at 6, 12, and 24 months was 78% (95% CI: 74 to 82), 86% (95% CI: 83 to 89), and 89% (95% CI: 86 to 92), respectively (Fig. 1A). In adjusted analysis, the probability of virological success was

lower in patients receiving a PI-based regimen [relative risk (RR) = 0.57, 95% CI: 0.44 to 0.74] and was higher in older patients (RR = 1.19, 95% CI: 1.11 to 1.27). Of the 42 (11%) patients who did not achieve initial virological success, 23 (55%) died. The most common cause of death was tuberculosis (6 patients). Baseline resistance tests were available for 16 (38%) of these 42 patients, and no primary drug resistance mutation was found. Receiving a PI-based regimen and being younger were the 2 independent risk factors for not achieving virological success (odds ratio = 2.23, 95% CI: 1.10 to 4.59 for PI compared with NNRTI and 0.65, 95% CI: 0.44 to 0.98 per 10-year increase). Patients who did not achieve virological success had significantly lower adherence than those who did ($P = 0.005$).

Virological Failure After Initial Virological Success

The 324 patients who achieved initial virological success were followed up for a total of 1530 person-years until censoring or first virological failure. Of these, 79 (24%) experienced virological failure, and 127 (39%) patients had a single increase of their VL ≥ 1000 copies/mL not confirmed by a consecutive test. The overall cumulative risk of virological failure was 5% (95% CI: 3 to 7) at 12 months, 16% (95% CI: 13 to 20) at 24 months, and 25% (95% CI: 21 to 30) at 60 months (Fig. 1B). Restricting the subset to patients who

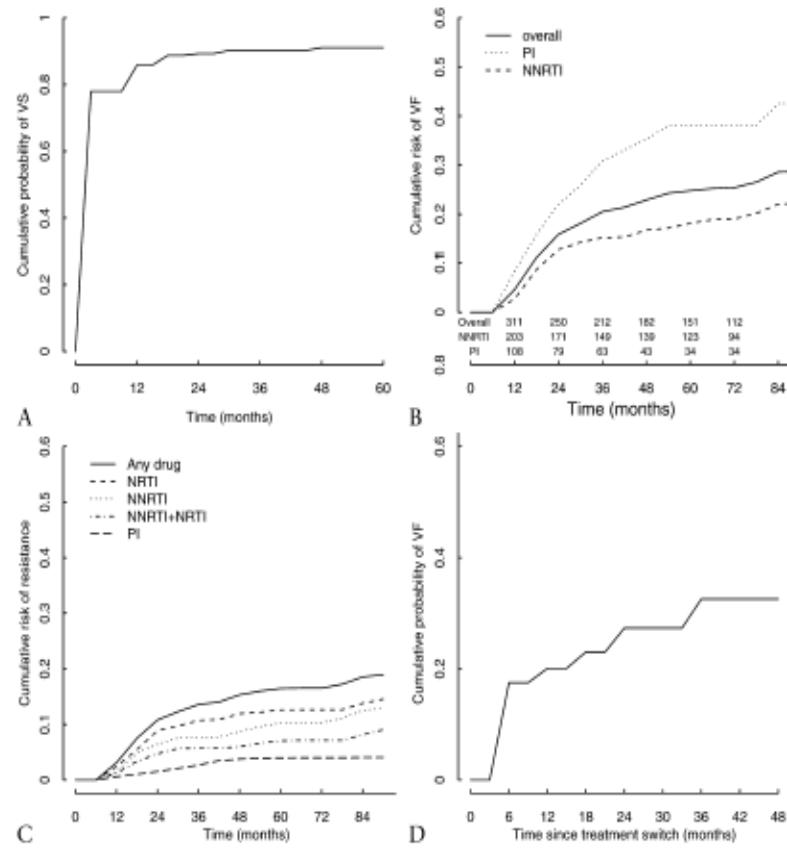


FIGURE 1. Cumulative probability of A, top left panel: achieving an undetectable VL; B, top right panel: experiencing virological failure (receiving a first-line regimen); C, bottom left panel: experiencing resistance mutation; D, bottom right panel: experiencing virological failure (receiving a second-line regimen). VS, virological success; VF, virological failure.

received an NNRTI-based regimen, this risk was 3% (95% CI: 1 to 5) at 12 months, 12% (95% CI: 9 to 17) at 24 months, 16% (95% CI: 12 to 21) at 48 months, and 18% (95% CI: 13 to 23) at 60 months. If the definition of virological failure was changed to any VL ≥ 1000 copies/mL, the estimated risk increased to 7% at 12 months, 22% at 24 months, and 39% at 60 months. In adjusted analysis, the risk of virological failure was higher in patients who were receiving a PI-based regimen, were younger, and had a mean adherence <80% (Table 2). When adherence was considered as a continuous variable, a nonlinear relationship with the risk of virological failure was found (Fig. 2, $P = 0.05$).

The mean CD4-cell count at virological failure was 340 cells/mm³ (IQR = 178–481) versus 410 cells/mm³ (IQR = 257–525) in patients with no virological failure and matched for follow-up duration, age, sex, baseline CD4, and clinical stage ($P < 0.001$). The mean change in CD4-cell count over the first 6 months after virological failure was also poorer compared with matched control patients (+4 cells/mm³ versus +30 cells/mm³ in controls, $P = 0.04$). Interestingly, only 28 patients (35%) met the WHO criteria for immunologic failure at the time of virological failure.

Drug Resistances

The results of a genotypic resistance test performed before HAART initiation were available for 48 (60%) of those who experienced virological failure. Only one drug resistance mutation was detected (resistance to lamivudine). Conclusive genotypic resistance tests were available for 53 (67%) patients (31 patients receiving a PI-based regimen and 22 an NNRTI). Among these 53 individuals, 32 (60%) were at least resistant to one drug (77% and 48% of those receiving an NNRTI and a PI-based regimen, respectively). Seventeen (77%) NNRTI mutations and 7 (23%) PI mutations were found in patients receiving these drugs. Twenty-one patients (40%) had dual-class resistances. The most common resistance to NRTIs was the mutation M184V to lamivudine ($n = 24$, 45%). A summary of the different resistances detected is given

in Figure 3 and Figure S1 (see **Supplemental Digital Content**, <http://links.lww.com/QAI/A365>). It should be noted that no resistance mutation was found in patients with a single VL ≥ 1000 copies/mL.

At the population level, the estimated cumulative risk of resistance to any drug was 3% (95% CI: 1 to 5) at 12 months, 11% (95% CI: 8 to 15) at 24 months, 16% (95% CI: 13 to 21) at 48 months, and 18% (95% CI: 13 to 21) at 60 months (Fig. 1C). The risk of resistance to any drug was positively associated with AIDS history at baseline and negatively associated with age, baseline CD4-cell count, and adherence (Table 2). As displayed in Figure 2, the relationship between the risk of resistance and adherence level was nonlinear ($P = 0.05$).

Outcomes After Switching to Second-Line HAART

Forty-eight (60%) patients with virological failure and 17 (40%) with no virological suppression were switched to second-line HAART. In the former, the median time between the first VL ≥ 1000 copies/mL and the treatment switch was 36 months (IQR = 18–54). This delay was larger for the first patients enrolled in the cohort (median delay was 33 months for those enrolled before 2001 versus 18 months for those enrolled after 2001, $P < 0.01$).

After excluding 7 patients who had been followed up for <6 months and/or had no VL measurement after switching to a second-line regimen and 5 others who achieved an undetectable VL before switching, 53 patients were eventually included in the subanalysis of virological response to second-line HAART. Their regimens included an NNRTI in 30 (57%) patients or a PI otherwise. Among the latter, lopinavir boosted with ritonavir, indinavir, and nelfinavir were used by 39%, 48%, and 13%, respectively. The median follow-up duration for these 53 patients was 45 months, and the median time on first-line HAART was 56 months (IQR = 44–70). Their median CD4-cell count and log₁₀ VL just before or at treatment switch were 239 cells/mm³ (IQR = 103–332) and 4.47 log₁₀ copies/mL (IQR = 4.04–5.00),

TABLE 2. Factors Associated With the Probability of Virological Failure and Drug Resistance Mutation in Univariate and Multivariate Analysis

	Virological Failure		Drug Resistance Mutation	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
Age*	0.88 (0.83 to 0.93)	0.80 (0.68 to 0.95)	0.85 (0.74 to 0.97)	0.82 (0.68 to 0.99)
Sex (female vs. male)	0.88 (0.66 to 1.20)		1.18 (0.78 to 1.77)	
AIDS history at baseline†	1.76 (1.33 to 2.33)		2.09 (1.42 to 3.07)	1.88 (1.03 to 3.41)
CD4-cell count‡	0.94 (0.88 to 1.01)		0.86 (0.76 to 0.96)	0.87 (0.74 to 1.01)
VL <100,000 copies/mL	1.55 (1.11 to 2.15)	1.78 (1.05 to 3.02)	1.54 (0.94 to 2.51)	
PI- versus NNRTI-based HAART	2.23 (1.61 to 3.08)	2.04 (1.28 to 3.27)	1.60 (0.97 to 2.63)	
Adherence§				
80%–95%	1.31 (0.71 to 2.42)	1.25 (0.68 to 2.32)		
<80%	4.08 (2.01 to 8.3)	3.64 (1.77 to 7.51)	2.05 (1.47 to 2.86)	2.1 (0.85 to 5.18)

*Per 10 years increase.

†CDC-C stage versus A or B.

‡Per 50 cells/mm³ increase.

§Compared with adherence $\geq 95\%$.

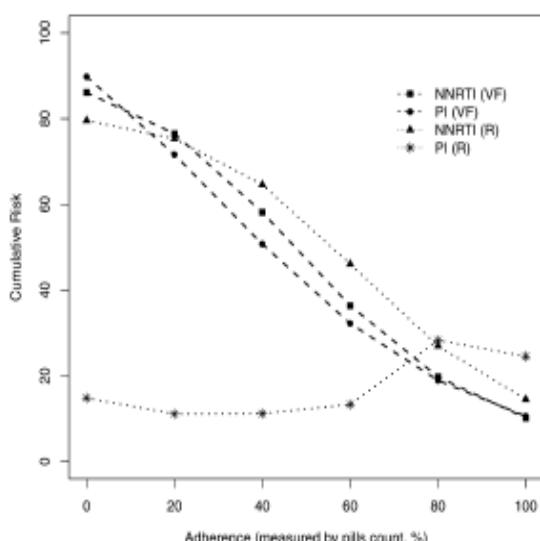


FIGURE 2. Cumulative risk of virological failure and drug resistance mutation with respect to adherence level in patients receiving a PI- or NNRTI-based first-line HAART. VF, virological failure; R, resistance.

respectively. Of these 53 patients, 43 (81%) achieved viral suppression <500 copies/mL within a median time of 6 months. All those who did not achieve virological suppression were receiving an NNRTI-based second-line regimen and 9 (90%) were documented as being resistant to at least one drug in their regimen before switching. After achieving virological suppression, 12 patients experienced a second episode of virological failure, which resulted in a cumulative risk of virological failure of 18% (95% CI: 8 to 28) at 6 months, 20% (95% CI: 10 to 30) at 12 months, and 27% (95% CI: 15 to 41) at 24 months (Fig. 1D). All of these patients (except one with no resistance data available) had dual-class resistances before or at the time of virological failure, and 8 (67%) of them were resistant to at least one of their second-line regimen drugs at virological failure. By contrast, their average adherence level was similar to that of patients who did not experience a second episode of virological failure (95% vs. 94.5%, $P = 0.6$).

DISCUSSION

In this study, using data from one of the first African cohorts of HIV-1-infected adults started on HAART, we were able to analyze together the virological outcomes for patients who were on first-line HAART for over >5 years and the virological response to second-line HAART. As the rollout of HAART in resource-limited countries continues, such results are important to inform calculations on the expected rate of virological failure and the effectiveness of second-line regimens.

We found that the overall virological response for patients on first-line HAART was good, with >80% of patients achieving virological success. This result is similar to those observed

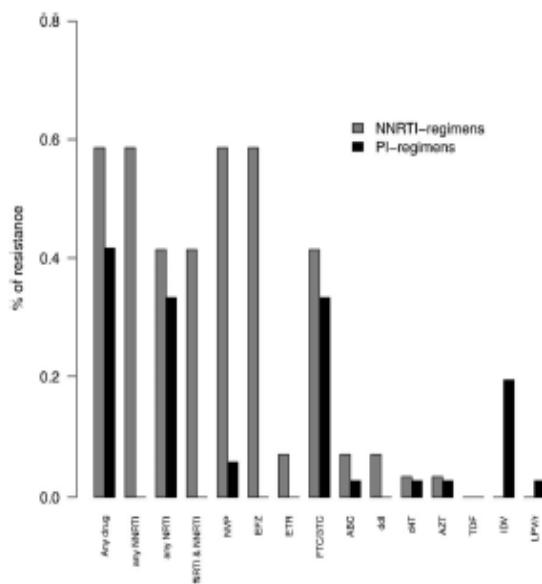


FIGURE 3. Frequency of the main resistances observed among patients started on a NNRTI or a PI-based regimen who experienced virological failure (cohort ANRS 1215). ABC, abacavir; AZT, azidothymidine; d4T, stavudine; ddI, didanosine; EFZ, efavirenz; ETR, etravirine; FTC/3TC, emtricitabine/lamivudine; IDV, indinavir; LPV/r, lopinavir boosted with ritonavir; NVP, nelfinavir; R, resistance; TDF, tenofovir; VF, virological failure.

in other African and non-African settings.^{24–30} The risk of virological failure rose sharply during the first 24 months of HAART then leveled off. This result confirms the importance of monitoring the initial response to treatment more closely. Although the proportion of patients with virological failure estimated was dependent of the definition adopted, drug resistances were observed only when a VL ≥ 1000 copies/mL was found in 2 consecutive tests, which suggests that this definition might have more clinical significance. Restricted to the first 2 years of follow-up, the estimated proportion of people with resistance to at least one drug in this cohort was similar to those from studies with intensive monitoring (more frequently than every 2 weeks) reported by Gupta et al.³¹ Over a longer follow-up time (up to 5 years), we found that the cumulative risk of virological failure and resistance was lower than or similar to those reported in high-resource countries.^{14,29,32–35} However, because of the delay between virological failure and treatment switching, it is likely that resistances' mutations were actually more frequent when the patients were started on second-line HAART. This delay may be attributable to several factors. First of all, the patients included in this cohort were among the first patients started on HAART in Senegal, and the number of drugs available at the beginning of cohort was very limited. Second, although VL and CD4-cell count were used for the monitoring, they were measured only twice a year. This resulted in a delay before a confirmatory VL was obtained, and a decision of switch to a second-line regimen made.

In 1998, indinavir was the only PI-based regimen available. Because it was poorly tolerated and several pills had to be taken daily, impaired adherence and consequently, early virological failure or switches were commonly observed in patients receiving this regimen. Moreover, stavudine that was used in most regimens of this cohort resulted also in frequent adverse events.³⁶ Although our results should be cautiously interpreted, as patients who receive were more likely to be sicker compared with those who receive an NNRTI, they are in line with the results from the PEARLS (ACTG A5175) trial.³⁷ However, it should be noted that despite the higher rate of virological failures, proportionally less resistance mutations were detected in patients receiving a PI-based regimen. The nonlinear relationship between adherence to PI-based regimens and the risk of virological failure or drug resistance found in this study—which is similar to results from other studies^{34,38}—suggests a greater robustness of PI-based regimens to drug resistance at low to moderate levels of adherence, although it is important to note that pills count is a very imperfect proxy for adherence.³⁹ Therefore, antiretroviral regimens based on boosted PI regimens which are more efficient and better tolerated compared with their nonboosted PI counterparts, might be a better alternative to NNRTI-based regimens when adherence is imperfect and when VL monitoring is infrequent, as is the case in many HIV programs in resource-limited settings.⁴⁰

Outcomes for second-line HAART were not as good as those observed for first-line HAART. Although the proportion of virological success in the former was only slightly lower than that in the latter, the probability of failure while receiving the former was more than twice as high. These results from a cohort of patients from West Africa fall within the range of those reported in a recent meta-analysis by Ajose et al.⁴¹ Likewise, we found that virological failure while receiving second-line regimens occurred early on after switching. An important concern is that virological failure occurred in a context of multiple resistances, which underscores the necessity of improving access to third-line regimens in resource-limited settings.

To our knowledge, this is the first study in a resource-limited setting to provide estimates of the risk of virological failure and drug resistance over such a long period. Moreover, because the data were prospectively collected, our estimates are less prone to bias compared with those from cross-sectional studies.^{33,42} However, several study limitations should be noted when interpreting our results. First, this study had a small population size limiting the precision of our estimates especially over the long term. A relatively large amount of data was missing, including genotypic tests for one-third of those who experienced virological failure. Such a situation is not uncommon,^{14,17,33} and we used a multiple-imputation approach to account for the missing data.¹⁷ Nevertheless, it is important to keep in mind the assumptions made with such a statistical approach: first, it was assumed that all patients with VL < 1000 copies/mL had no resistance mutation. Second, multiple imputation only works under the assumption that data were missing at random, conditionally on the observed variables.¹⁶ Although it cannot actually be checked, this assumption seems reasonable as most of the tests were missing because of logistic problems.

In conclusion, this study shows good virological outcomes for patients on first-line HAART for over > 5 years. However, outcomes for second-line HAART were not as good and most of the virological failure observed with second-line regimens occurred in the context of multiple resistances, emphasizing the importance of intensive monitoring and early adherence support, and the need to improve access to and availability of third-line regimens.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Jude Sweeney for his assistance in editing this manuscript.

REFERENCES

- Desclaux A, Lanièce I, Ndoye I, et al, eds. *The Senegalese Antiretroviral Drug Access Initiative: An Economic, Social, Behavioural and Biomedical Analysis*. Paris: ANRS, UNAIDS, WHO; 2002.
- Laurent C, Diakhate N, Gueye NF, et al. The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study. *AIDS*. 2002;16:1363–1370.
- Weidle PJ, Malambo S, Mwebaze R, et al. Assessment of a pilot antiretroviral drug therapy programme in Uganda: patients' response, survival, and drug resistance. *Lancet*. 2002;360:34–40.
- Seyler C, Anglaet X, Dukoury-Dogbo N, et al. Medium-term survival, morbidity and immunovirological evolution in HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy, Abidjan, Côte d'Ivoire. *Antivir Ther*. 2003;8:385–393.
- UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. Available at: http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm. Accessed December 2011.
- Etard JF, Ndiaye I, Thierry-Mieg M, et al. Mortality and causes of death in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Senegal: a 7-year cohort study. *AIDS*. 2006;20:1181–1189.
- Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F, et al. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet*. 2006;367:817–824.
- Keiser O, Chi BH, Gaponer T, et al. Outcomes of antiretroviral treatment in programmes with and without routine viral load monitoring in Southern Africa. *AIDS*. 2011;25:1761–1769.
- Keiser O, Twanya H, Boulle A, et al. Switching to second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: comparison of programmes with and without viral load monitoring. *AIDS*. 2009;23:1867–1874.
- Hosseinpour MC, van Oosterhout JJ, Weigel R, et al. The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy. *AIDS*. 2009;23:1127–1134.
- Landman R, Canestri A, Thiam S. First evaluation of d4T, ddI and EFZ in antiretroviral naïve patients in Senegal: ANRS 1206/IMEA 012 study. Paper presented at: Xth International Conference on AIDS and STDs in Africa; December 9–13, 2001; Ouagadougou, Africa.
- Landman R, Schiemann R, Thiam S, et al. Once-a-day highly active antiretroviral therapy in treatment-naïve HIV-1-infected adults in Senegal. *AIDS*. 2003;17:1017–1022.
- Landman R, Poupart M, Diallo M, et al. Tenovor-entecavir-efavirenz in HIV-1-infected adults in Senegal: a 96-week pilot trial in treatment-naïve patients. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2009;8:379–384.
- Phillips AN, Dunn D, Sabin C, et al. Long term probability of detection of HIV-1 drug resistance after starting antiretroviral therapy in routine clinical practice. *AIDS*. 2005;19:487–494.
- Djoko CF, Rimoin AW, Vidal N, et al. High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:323–329.
- Little RJA, Rubin DB. *Statistical Analysis With Missing Data*. Hoboken, NJ: Wiley; 2002.
- Abraham AG, Lau B, Deeks S, et al. Missing data on the estimation of the prevalence of accumulated human immunodeficiency virus drug

- resistance in patients treated with antiretroviral drugs in North America. *Am J Epidemiol.* 2011;174:727–735.
18. Klein J, Moeschberger M. *Survival Analysis. Techniques for Censored and Truncated Data*. 2nd ed. New York, NY: Springer; 2003.
 19. Turnbull B. The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data. *J R Stat Soc. 1976;38:290–295.*
 20. Efron B, Tibshirani R. *An Introduction to the Bootstrap*. New York, NY: Chapman & Hall; 1993.
 21. Carstensen B. Regression models for interval censored survival data: application to HIV infection in Danish homosexual men. *Stat Med.* 1996;15:2177–2189.
 22. Wood SN. *Generalized Additive Models: An Introduction With R*. New York, NY: Chapman & Hall/CRC; 2006.
 23. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2009.
 24. Ferradini L, Jeannin A, Pinoges L, et al. Scaling up of highly active antiretroviral therapy in a rural district of Malawi: an effectiveness assessment. *Lancet.* 2006;367:1335–1342.
 25. Laurent C, Kouanfack C, Koulla-Shire S, et al. Long-term safety, effectiveness and quality of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine and lamivudine. *AIDS.* 2007;21:768–771.
 26. Laurent C, Kouanfack C, Laborde-Balen G, et al. Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:825–833.
 27. Brattstein P, Brinkhof MW, Dabis F, et al. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet.* 2006;367:817–824.
 28. Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, et al. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:155–166.
 29. Ledergerber B, Egger M, Opravil M, et al. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet.* 1999;353:863–868.
 30. Paredes R, Mocroft A, Kirk O, et al. Predictors of virological success and ensuing failure in HIV-positive patients starting highly active antiretroviral therapy in Europe: results from the EuroSIDA study. *Arch Intern Med.* 2000;160:1123–1132.
 31. Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, et al. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:409–417.
 32. Mocroft A, Ruiz I, Reiss P, et al. Virological rebound after suppression on highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2003;17:1741–1751.
 33. Pillay D, Green H, Matthias R, et al. Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom. *J Infect Dis.* 2005;192:967–973.
 34. Harrigan PR, Hogg RS, Dong WW, et al. Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naïve cohort initiating triple antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2005;191:339–347.
 35. Richman DD, Morton SC, Wrin T, et al. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS.* 2004;18:1393–1401.
 36. Mercier S, Gueye NF, Counil A, et al. Lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-1-infected adults on 4- to 9-year antiretroviral therapy in Senegal: a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51:224–230.
 37. Campbell T, Smeaton L, De Gruttola V. PEARLS (ACTG A5175): a multinational study of didanosine-EC, emtricitabine and abacavir vs. co-formulated zidovudine/lamivudine and efavirenz for initial treatment of HIV-1 infection. Paper presented at: XVII International AIDS Conference 2008; August 3–8, 2008; Mexico City, Mexico.
 38. King MS, Brun SC, Kempf DJ. Relationship between adherence and the development of resistance in antiretroviral-naïve, HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir or nelfinavir. *J Infect Dis.* 2005;191:2046–2052.
 39. Gardner EM, Burman WI, Steiner JF, et al. Antiretroviral medication adherence and the development of class-specific antiretroviral resistance. *AIDS.* 2009;23:1035–1046.
 40. Adlington R, Richens J, Shahmanesh M. First-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: time to reconsider? *J Infect Dis.* 2009;199:1407; Author reply–8.
 41. Ajose O, Mookerjee S, Mills EJ, et al. Treatment outcomes of patients on second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *AIDS.* 2012;26:929–938.
 42. Harrigan PR, Wyrhoven B, Brumme ZL, et al. HIV-1 drug resistance: degree of underestimation by a cross-sectional versus a longitudinal testing approach. *J Infect Dis.* 2005;191:1325–1330.

APPENDIX

The ANRS 1215 study group: I. Ndiaye (Multisectorial AIDS Program, Dakar, Senegal), Alice Desclaux, E. Delaporte, J. F. Etard, C. Laurent, B. Taverne, M. Peteirs, P. De Beaudrap (UMI 233, Research Institute for Development (IRD)/University of Montpellier, Dakar, Senegal and Montpellier, France), M. Basty Fall, A. B. Dieng, A. Diouf, C. Massidi, A. Sarr, I. Zié (Regional Research and Training Center for HIV/AIDS, Fann University Teaching Hospital, Dakar, Senegal), I. Laniece, M. Meynard (French Ministry of Foreign Affairs, Dakar, Senegal), I. Ndiaye, A. Ndir, C. T. Ndour, C. S. Senghor, P. S. Sow, (Department of Infectious Diseases, Fann University Teaching Hospital, Dakar, Senegal), N. F. Ngom Guéye, (Ambulatory Care Unit-Red-Cross, Fann University Teaching Hospital, Dakar, Senegal), K. Ba Fall, P. M. Guéye, (Military Hospital of Dakar, Senegal), S. Mboup, N. C. Touré Kane (Le Dantec University Teaching Hospital, Virology and Bacteriology Laboratory, Dakar, Senegal), K. Diop, B. Ndiaye (Central Pharmacy, Fann University Teaching Hospital, Dakar, Senegal).

Article 2 :

Thiam M, Diop-Ndiaye H, Diouf AD, Vidal N, Ndiaye O, Ndiaye I, Ngom-Gueye NF, Diallo S, Diongue OD, Camara M, Seck A, Mboup S, Toure-Kane C. **HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system.** *J. Clin Microbiol.* 2013, 51 (2): 578–84

II.2. Détermination de la prévalence des mutations de résistance aux ARV et la variabilité génétique du VIH-1 chez une population sous ARV et suivie selon l'approche santé publique au Sénégal

II.2.1. Problématique

Après la mise en place de l'ISAARV depuis 1998 (**Desclaux et coll., 2002**), il a été démontré que le HAART accompagné d'un suivi clinique et biologique, réduisait l'émergence des souches résistant au traitement ARV chez des patients infectés par le VIH-1 au Sénégal (**Vergne et coll., 2003**). Cependant, le nombre insuffisant de laboratoire fait que les données biologiques, plus particulièrement la charge virale, ne sont pas toujours accessibles. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande un changement de 1^{ère} ligne en 2^{nde} ligne de thérapie antirétrovirale en se basant seulement sur les critères cliniques et/ou immunologiques, lorsque la charge virale n'est pas disponible (<http://www.who.int/hiv/pub/ary/adult2010/en/>). Des études ont montré une prévalence élevée de virus résistants aux ARV (**Kantor et coll., 2004 ; Cozzi-Lepri et coll., 2009**) et une forte accumulation des TAMs en utilisant ces recommandations (**Hosseinpour et coll., 2009**). La plupart des données sur la réponse au traitement ARV au Sénégal, provient d'études prospectives incluant un suivi virologique dans les conditions standards (**Laurent et coll., 2002 ; Laurent et coll., 2005 ; Wallis et coll., 2009**). Cependant, nous n'avions pas de données sur la résistance aux ARV chez des patients sous traitement et suivis selon l'approche santé publique de l'OMS.

II.2.2. Objectif

Le but de cette étude était de documenter la diversité génétique et de déterminer la prévalence des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1 et suivis selon l'approche santé publique au Sénégal.

II.2.3. Méthodologie

➤ Population d'étude, Charge virale et étude de résistance

L'étude a été effectuée chez des patients de la cohorte de l'ISAARV mis sous ARV entre 2001 et 2012. Un prélèvement de sang total a été effectué sur tube EDTA chez ces patients suivis au niveau des sites cliniques de Dakar. L'étude a été approuvée par le comité éthique

du gouvernement Sénégalais. Il s'agit d'une étude transversale chez des patients en échec virologique parmi ceux supposés avoir développé un échec thérapeutique. Les échantillons ont été sélectionnés sur la base d'une $CV > 3 \log_{10}$ copies/ml, déterminée par la technique de Abbott RealTime HIV-1 m2000rt (Abbott Laboratories, Chicago, IL). La technique de génotypage développée par l'ANRS AC 11 (<http://www.hivfrenchresistance.org/>) et/ou celle du ViroSeq HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, San Francisco, CA), ont été utilisées pour l'étude des mutations de résistance. Pour la technique maison de l'ANRS, après une extraction avec le kit QIamp Viral RNA (Qiagen, Valencia Spain) et une purification, les produits de PCR ont été directement séquencés utilisant l'ABI 3100-Avant avec la technique des terminateurs de chaîne. Les séquences obtenues, ont été éditées avec Seqman grâce au logiciel DNAStar v.5.08 (lasergene, Madison, WI). La base de données de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) a été utilisée pour déterminer les différentes mutations de résistance sur la totalité de la protéase et les 240 premiers acides aminés de la transcriptase inverse. Pour le ViroSeq, après extraction, l'ARN plasmatique est amplifié par une réaction de rétrotranscription, suivie d'une seule étape de PCR pour générer un ADN double brin de 1800 pb. Les produits de PCR seront ensuite purifiés et séquencés grâce à l'ABI 3100-Avant avec la technique des terminateurs de chaîne. Le séquençage des produits de PCR a été effectué sur la totalité de la protéase et 320 premiers acides aminés de la transcriptase inverse. Les séquences ont été ensuite analysées avec le logiciel ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.8 (Celera Diagnostic, San Francisco, CA) afin de générer un rapport de résistance.

➤ Analyse phylogénétique

Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Seaview v.4.3.0 pour déterminer les différents sous-types, CRFs et URFs dans la population d'étude. L'ensemble des sous-types purs et CRFs qui circulent en Afrique de l'Ouest et disponibles dans la base de données de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>) a été inclus dans l'analyse phylogénétique. La présence d'éventuels recombinants, a été confirmée par bootscanning avec le Simplot v.3.5.1. L'arbre phylogénétique final a été élaboré avec un nombre minimum de référence grâce au PhyML V.3.

II.2.4. Résultats

➤ Caractéristiques de la population d'étude

L'étude a porté sur un nombre de 72 patients dont l'âge était compris entre 20 et 57 ans. Le sexe ratio était de 0,60 comprenant, 45 (60,81%) femmes et 27 (37,50%) hommes.

Le tableau VIII ci-dessous résume les données virologiques, de résistances et thérapeutiques des patients.

Tableau VIII : Les caractéristiques de la population d'étude

Paramètres	1^{ière} Ligne ARV		2^{nde} Ligne ARV	
	n	%	n	%
Charge Virale (log)				
3 -3.67	13	22,22	2	11,11
3.67-4	8	14,81	1	5,56
4-5	22	40,74	7	38,89
> 5	12	22,22	8	44,44
Traitement				
AZT+3TC+NVP/EFV	38	70,37	-	-
D4T+3TC+NVP/EFV	8	14,81	-	-
DDI+3TC+EFV	4	7,41	-	-
TDF+3TC+NVP/EFV	3	5,56	-	-
3TC+DDI+NVP	1	1,85	-	-
TDF+ABC/DDI/3TC/FTC+LPV/r	-	-	12	66,67
AZT+3TC/ABC+LPV/r	-	-	4	22,22
ABC+DDI+DRV/r	-	-	1	5,56
DDI+3TC+IDV/r	-	-	1	5,56
Bilan (M=mois)				
M=12	11	20,37	-	-
12<M<24	10	18,52	4	16,67
M>24	33	61,11	15	83,33
Résistance aux ARV				
NRTIs	1	1,85	1	5,56
NNRTIs	5	9,26	2	11,11
NRTIs+PIs	-	-	4	22,22
NNRTIs+NRTIs	31	57,41	7	38,89
All drugs	2	3,70	2	11,11
Any drug	15	27,78	2	11,11

La médiane de suivi était de 40 mois [12-123] et la charge virale médiane de 4,73 log₁₀ copies/ml. Les schémas thérapeutiques étaient composés d'une 1^{ière} ligne avec INTI+EFV/NVP (54/72, 75%) et une 2^{nde} ligne avec INTI+1IP/r (18/72, 25%). Cinquante sept (76,39%) des patients ont eu au moins une mutation de résistance aux ARV. Les taux de résistance étaient de 72,22 et 88,89 respectivement chez les patients sous 1^{ière} ligne et 2^{nde} ligne de traitement ARV.

➤ Analyse phylogénétique

La figure 32 ci-dessous montre la variabilité génétique au sein de la population d'étude.

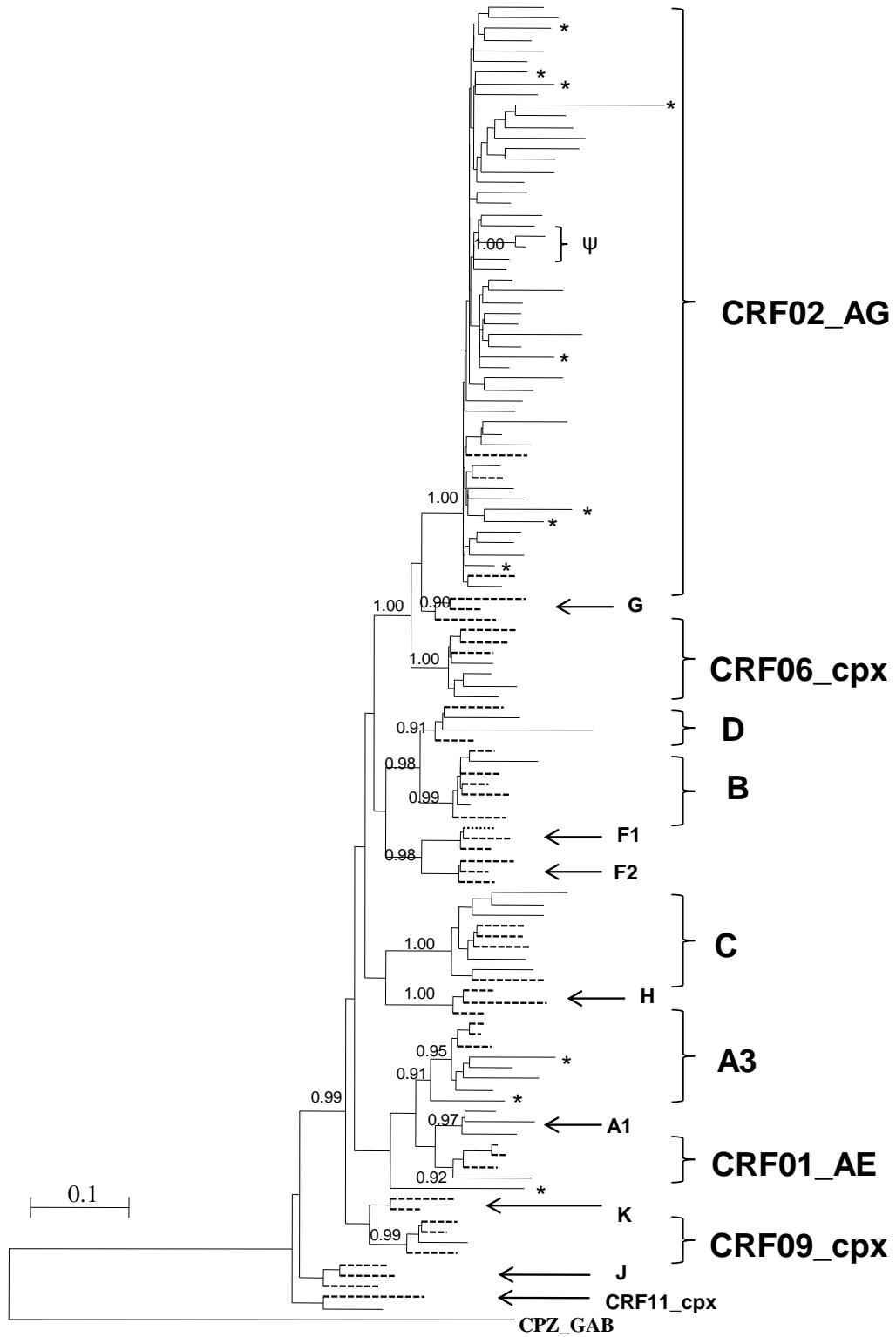


Figure 32 : La variabilité et relation phylogénétique au sein de la population d'étude

Les séquences de référence sont représentées en tiret et celles de la population d'étude en trait plein. Les signes (*) et (ψ) ont été utilisés pour symboliser respectivement la présence de recombinants et une probable chaîne de transmission entre deux patients dont un homme et une femme.

La variabilité génétique est caractérisée par la prédominance du CRF02_AG (59,72%), la présence d'autres sous-types/CRFs à savoir : C (6,94%), A3 (4,17%), B (2,78%), D (2,78%), CRF06_cpx (5,56%),, CRF09_cpx (1,39%) et CRF01_AE (1,39%) et enfin 11 URFs.

➤ Analyse des mutations de résistance aux ARV

Les différentes positions de résistance aux INTIs retrouvées chez les patients, sont représentées dans le tableau IX ci-dessous.

Tableau IX : Les mutations de résistance au niveau de la TI associées à une résistance aux INTIs

Sous-types	No. de séquences	M41	D67	K70	L210	T215	K219	K65	L74	Y115	M184	E44	V118	69	
A3	3												V₁		
B	2														
C	5												V₄		
CRF01_AE	1					A₁, F₁	E₁				V₁			N₁	
				R ₅ , K/N ₁ ,		Y ₈ , F ₆ , I ₁ ,	E ₄ , Q ₃ ,							N ₁ ,	
CRF02_AG	43	L ₇	N ₈ , G ₁	G/R ₁ , G ₁	W ₄	S/Y ₁ , I/V ₁	N ₁			V ₃	F ₁	V ₂₆ , I ₁	D ₃	I ₃	P/T ₁
CRF02_AG/A	2	L ₁										V₂			
CRF02_AG/A3	3									V₁		V₃			
CRF02_AG/CRF06_cpx	1														
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1		N ₁				Q ₁					V₁			
CRF06_cpx	4											V₂			
CRF09_cpx	1														
CRF09_cpx/CRF02_AG	1														
D	2		N ₁	R ₁			Q ₁					V₁			
G/CRF02_AG/A	1	L ₁			W ₁				I ₁			V₁		I₁	
CRF02_AG/C/A	1							R ₁		F ₁		V₁			
CRF11_cpx/CRF02_AG	1				S/Y ₁						V₁				
TOTAL	72	9	11	9	5	19	11	1	5	2	44	3	4	3	

Le tableau montre que les CRF02_AG ont développé toutes les positions de mutations associées à une résistance aux INTIs à l'exception de la position K65. Cependant, le sous-type B et les URF (CRF09_cpx, CRF02_AG/CRF06_cpx et le CRF09_cpx/CRF02_AG), n'ont développé aucune position de résistance aux INTIs. Parmi les différentes mutations de résistance aux INTIs, nous avons la prédominance des TAMs (50,79%), suivie de la mutation M184V avec 34,92%.

Le tableau X ci-dessous montre les différentes positions de résistance associées à une résistance aux INNTIs chez les patients étudiés.

Tableau X : Les mutations de résistance au niveau de la TI associées à une résistance aux INNTIs

Sous-types	No. de séquences	L100	K101	K103	V106	V108	Y181	Y188	G190	P225
A3	3		P ₁ , E ₁	N ₁		I ₁			A ₁	
B	2			N ₁						
C	5			N ₂					A ₂	
CRF01_AE	1					C ₁	C ₁			
							C ₁ ,		A ₃ ,	
CRF02_AG	43	I ₂		N ₂₁		I ₇	C/Y ₁	L ₂	A/G ₁	H ₃
CRF02_AG/A	2			N ₂			C ₁			H ₂
CRF02_AG/A3	3			N ₁						
CRF02_AG/CRF06_cpx	1									
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1			N ₁						
CRF06_cpx	4			N ₁			C ₁			
CRF09_cpx	1									
CRF09_cpx/CRF02_AG	1									
D	2									
G/CRF02_AG/A	1			N ₁		I ₁				
CRF02_AG/C/A	1						C ₁	L ₁		
CRF11_cpx/CRF02_AG	1									
TOTAL	72	2	2	31		10	6	3	7	5

Les CRF02_AG ont développé toutes les positions de mutations associées à une résistance aux INNTIs à l'exception des positions K101 et V106. Le sous-type D, et les URFS : CRF09_cpx/CRF02_AG, CRF11_cpx/CRF02_AG et CRF02_AG/CRF06_cpx et le CRF09_cpx n'ont développé aucune position de résistance aux INNTIs. Nous avions aussi noté une prédominance de la mutation K103N avec 46,27%, suivie des mutations aux positions V108, G190 et Y181.

Contrairement au taux élevé de positions de résistance aux INTIs et aux INNTIs, nous avons un nombre limité de positions associées à une résistance aux IPs, comme indiqué dans le tableau XI ci-dessous.

Tableau XI : Les mutations de résistance au niveau de la protéase associées à une résistance aux IPs

Sous-types	No. de séquences	V32	D30	M46	I47	G48	I50	I54	Q58	T74	L76	V82	I84	N88	L90
A3	3														
B	2														
C	5														
CRF01_AE	1				I ₁	V ₁			V ₁			A ₁	V ₁		
CRF02_AG	43				I ₄	V ₂			V ₃			V ₂	V ₄		M ₁
CRF02_AG/A	2														
CRF02_AG/A3	3														
CRF02_AG/CRF06_cpx	1														
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1														
CRF06_cpx	4														
CRF09_cpx	1														
CRF09_cpx/CRF02_AG	1														
D	2						A ₁				F ₁				
G/CRF02_AG/A	1				I ₁							V ₁			
CRF02_AG/C/A	1														
CRF11_cpx/CRF02_AG	1														
TOTAL	72			6	3		2	3		3	6		1		1

Nous avions documenté 25 positions de résistance chez les 57 patients qui ont montré une résistance aux IPs. Plusieurs mutations de résistance ont été notées avec la prédominance de M46I et L76V/E représentant chacune 24%.

II.2.5. Conclusion

Cette étude transversale réalisée chez des patients suivis selon l'approche de santé publique, montre qu'un taux élevé (76,39%, soit 55/72) de patients développe au moins une mutation de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 40 mois. Les taux de résistance chez les patients en échec virologique de 1^{ière} et de 2^{nde} ligne sont respectivement : 72,22 et 88,89%. Pour les patients en 1^{ière} ligne, le taux élevé de résistances est lié aux schémas thérapeutiques incluant les INTIs et les INNTIs (57,41%). Cependant, les taux de résistance chez les patients en 2^{nde} ligne sont de 36,84 et 21,05%, respectivement pour les combinaisons de molécules associant : INTIs + INNTIs et INTIs + IPs. Parmi les mutations associées à une résistance aux INTIs, nous trouvons une prédominance des TAMs (50,79%), suivis de la mutation M184V/I (34,92%). Pour les mutations associées à une résistance aux INNTIs, nous obtenons la prédominance du K103N (46,27%), suivi des mutations aux positions V108, Y181 et K101. Contrairement aux mutations associées à une résistance aux INTIs et aux INNTIs, nous ne trouvons qu'un faible nombre de mutations associées à une résistance aux IPs. Parmi ces mutations, nous notons la prédominance de M46I et L76V, présentes chacune à 24%. Malgré sa population d'étude relativement faible, cette étude pose le problème d'une prévalence élevée de résistances aux ARV et une accumulation des TAMs quand la charge virale n'est pas effectuée régulièrement. Ces résultats démontrent la nécessité d'améliorer le monitoring virologique des patients sous ARV dans les pays à ressources limitées. L'étude des mutations de résistance a été effectuée en utilisant à la fois, la technique maison de l'ANRS et la technique commerciale du ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0. Cette dernière étant optimisée à partir des souches de VIH-1 sous type B, est souvent confrontée à des échecs d'amplification et/ou de séquençage pour certaines souches non-B. Dans le but d'optimiser le suivi virologique des patients sous ARV, nous avons ainsi consacré le troisième objectif de notre travail de thèse sur l'étude des performances de cette technique chez les souches de VIH-1 non-B qui circulent au Sénégal.

**HIV-1 Genetic Diversity and Drug
Resistance among Senegalese Patients in
the Public Health System**

Moussa Thiam, Halimatou Diop-Ndiaye, Aminata Diaw
Diouf, Nicole Vidal, Ousseynou Ndiaye, Ibrahima Ndiaye,
Ndeye Fatou Ngom-Gueye, Sada Diallo, Oumy Diop
Diongue, Makhtar Camara, Abdoulaye Seck, Souleymane
Mboup and Coumba Toure-Kane
J. Clin. Microbiol. 2013, 51(2):578. DOI:
10.1128/JCM.02452-12.
Published Ahead of Print 12 December 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/51/2/578>

These include:

REFERENCES

This article cites 38 articles, 12 of which can be accessed free
at: <http://jcm.asm.org/content/51/2/578#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on January 25, 2013 by Moussa THIAM

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

HIV-1 Genetic Diversity and Drug Resistance among Senegalese Patients in the Public Health System

Moussa Thiam,^a Halimatou Diop-Ndiaye,^a Aminata Diaw Diouf,^a Nicole Vidal,^b Ousseynou Ndiaye,^a Ibrahima Ndiaye,^c Ndeye Fatou Ngom-Gueye,^d Sada Diallo,^a Oumy Diop Dioungue,^a Makhtar Camara,^a Abdoulaye Seck,^a Souleymane Mboup,^a Coumba Toure-Kane^a

Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Le Dantec, Dakar, Senegal^a; UMI 233, IRD, Montpellier, France^b; Centre Régional de Recherche et Formation sur le VIH/SIDA, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal^c; Centre de Traitement Ambulatoire, CHU de Fann, Dakar, Senegal^d

In this study, we investigated the prevalence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) drug resistance mutations and genetic variability among Senegalese patients undergoing highly active antiretroviral therapy (ART) in the public health system. We conducted a cross-sectional study of 72 patients with suspected therapeutic failure. HIV-1 genotyping was performed with Viroseq HIV-1 Genotyping System v2.0 or the procedure developed by the ANRS AC11 resistance study group, and a phylogenetic analysis was performed. The median follow-up visit was at 40 (range, 12 to 123) months, and the median viral load was 4.67 (range, 3.13 to 6.94) log₁₀ copies/ml. The first-line therapeutic regimen was nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus efavirenz (EFV) or NRTIs plus nevirapine (NVP) (54/72 patients; 75%), and the second-line therapy was NRTIs plus a protease inhibitor (PI/r) (18/72; 25%). Fifty-five patients (55/72; 76.39%) had at least one drug resistance mutation. The drug resistance rates were 72.22 and 88.89% for the first-line and second-line ARTs, respectively. In NRTI mutations, thymidine analog mutations (TAMs) were found in 50.79% and the M184V mutation was found in 34.92% of the samples. For non-NRTI resistance, we noted a predominance of the K103N mutation (46.27%). For PI/r, several cases of mutations were found with a predominance of M46I and L76V/F at 24% each. The phylogenetic analysis revealed CRF02_AG as the predominant circulating recombinant form (43/72; 59.72%). We found a high prevalence of resistance mutations and a high rate of TAMs among Senegalese patients in the public health system. These findings emphasize the need to improve virological monitoring in resource-limited settings.

Phylogenetic analyses of many HIV-1 strains isolated from diverse geographic origins have revealed four distinct groups of viruses, namely, groups M, N, O, and P. Group M, which is responsible for the global pandemic, can be further subdivided into subtypes (A to D, F to H, J, and K), subsubtypes, and numerous circulating recombinant forms (CRF01 to CRF54; <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). In Senegal, circulating HIV-1 strains have been characterized and show a high level of genetic diversity, with the predominance of CRF02_AG among members of the general population (1, 2) and female sex workers (3). However, a high prevalence of subtype C was noted among men who have sex with men (4).

In developing countries where non-B subtypes are predominant, antiretroviral therapy (ART) has become increasingly available, resulting in the improved health and survival of patients infected with HIV-1. The emergence of HIV resistance, due to mutations in the viral protease and reverse transcriptase (RT) genes, is the major cause of ART failure. The development of drug resistance requires the occurrence of both antiretroviral drug exposure and ongoing viral replication (5). One of the first ART initiatives sponsored by an African government was launched in Senegal in 1998. Patients were monitored clinically and biologically by plasma HIV-1 RNA load determination, CD4 cell counting at the baseline and at 6-month time intervals, and monthly medical examinations (6). According to the 2010 World Health Organization (WHO) guidelines, the first-line drug regimen for adults and adolescents in resource-limited settings should contain two nucleoside RT inhibitors (NRTIs) and one non-NRTI (NNRTI). After first-line ART failure, a boosted protease inhibitor with two NRTIs has been recommended for second-line ART

(7). In a prospective observational cohort study, it was shown that the implementation of highly active ART (HAART), in combination with clinical, biological, and logistical monitoring, reduced the emergence of resistant strains in Africa (8). The WHO guidelines also suggest that the first-line ART regimen should be switched after immunological or clinical failure when plasma HIV-1 RNA load tests are not available (7). However, previous studies reported the development of resistance mutations when the switch was performed solely on the basis of immunological or clinical monitoring of patients (9, 10). A similar study of patients receiving first-line ART in Africa revealed a high rate of thymidine analog mutation (TAM) accumulation in patients with immunological or clinical failure when following the WHO guidelines (11). Most published data on ART treatment in Senegal have resulted from structural prospective studies, including a biological follow-up study according to the best standards of care (6, 12, 13). However, no data on HIV drug resistance (HIVDR) was available from patients undergoing HAART in the public health system. The aim of this study was to investigate the prevalence of HIVDR mutations and the genetic diversity in a routinely treated general population group.

Received 14 September 2012 Returned for modification 31 October 2012

Accepted 30 November 2012

Published ahead of print 12 December 2012

Address correspondence to Coumba Toure-Kane, ctourekan@yahoo.co.uk.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02452-12

Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on January 25, 2013 by Moussa THIAM

MATERIALS AND METHODS

Spectmen collection and viral load and resistance testing. We obtained blood samples by venipuncture from patients at three different clinical sites in Dakar, the capital of Senegal, and collected them in EDTA tubes. The patients were enrolled in the Senegalese Antiretroviral Drug Access Initiative (ISAARV) from 2001 to 2012. We conducted a cross-sectional study of patients with known virological failure among patients suspected to have experienced therapeutic failure. The samples were selected on the basis of a viral load of $>3 \log_{10}$ copies/ml by the Abbott RealTime HIV-1 m2000rt quantitative assay (Abbott Laboratories, Chicago, IL). Resistance testing was performed on the plasma samples using Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System version 2.0 according to the manufacturer's instructions (Celera Diagnostics, San Francisco, CA) or the procedure developed by the ANRS AC11 resistance study group (<http://www.hivfrenchresistance.org/>). For ViroSeq, RNA was amplified by reverse transcription, followed by a one-step PCR to generate a fragment of 1,800 bp. The PCR products were then purified and used for direct sequencing on an ABI 3100-Avant system using the BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Sequencing was performed to cover the entire protease gene and RT amino acids 1 to 320. Sequences were analyzed using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System software v2.8 (Celera Diagnostics, San Francisco, CA), which generated a drug resistance report. For the ANRS AC11 resistance method, RNA extraction from plasma was performed using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. The PCR products were purified (Qiagen, Valencia, Spain) and directly sequenced on ABI3100-Avant using BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The sequences generated were edited using the SeqMan II software program from the DNASTar package v.5.08 (LaserGene, Madison, WI). To determine the resistance mutations, the entire protease gene and at least the first 240 amino acids encoded by the RT gene were analyzed with the Stanford HIVDR database tools (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Phylogenetic analyses. HIV-1 subtype and CRF designations were determined by phylogenetic tree analysis. The nucleotide sequences generated were aligned, and a neighbor-joining tree was drawn with 100 bootstrap replicates, as implemented in the Seaview software (14). All pure subtypes and CRFs available in the Los Alamos database and circulating in West Africa were included in the analysis. To determine whether the viruses were recombinant or not, similarity analysis and bootstrapping were performed with the Simplot version 3.5.1 software. The final tree was drawn with the minimal number of references, i.e., excluding those that were not represented in the data set. Phylogenies over trimmed alignment were inferred by using PhyML version 3 under the GTR+I+G model of nucleotide substitution. An approximate likelihood ratio test was used to assess confidence in topology.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of the HIV-1 isolates used in this study have been deposited in GenBank under accession numbers JN673567, JN673569, JN673574, JN673576, JN673579, JN673583, JN673584, JN673595 to JN673598, JN673603 to JN673618, JN673621, JN673628, JN673637, JN673647, JN673677, JN673678, JN673683 to JN673686, JN673688, JN673691 to JN673693, JN673697, JN673698, JN673703, JN673708, JQ855853 to JQ855855, JX187611 to JX187622, JX227940, JX187624 to JX187630, and KC176534 to KC176537.

RESULTS

Patient group characteristics. Table 1 summarizes the virological, drug resistance, and therapeutic patient group data. The sex ratio was 0.60, including 45 (60.81%) women and 27 (37.50%) men. The 72 participants' ages ranged from 20 to 57 years in the selected group. The median follow-up visit was at 40 (range, 12 to 123) months, and the median viral load was 4.73 (range, 3.13 to 6.94) \log_{10} copies/ml. The first-line therapeutic regimen was NRTIs plus efavirenz (EFV)/nevirapine (NVP) (NRTIs-EFV/

TABLE 1 Virological, drug resistance, and therapeutic patient group data

Parameter ^a	No. (%) of patients	
	First-line ART (n = 54)	Second-line ART (n = 18)
Viral loads (\log_{10})		
3–3.67	12 (22.22)	2 (11.11)
3.67–4	8 (14.81)	1 (5.56)
4–5	22 (40.74)	7 (38.89)
>5	12 (22.22)	8 (44.44)
Treatments		
AZT + 3TC + NVP/EFV	38 (70.37)	
d4T + 3TC + NVP/EFV	8 (14.81)	
DDI + 3TC + EFV	4 (7.41)	
TDF + 3TC + NVP/EFV	3 (5.56)	
3TC + DDI + NVP	1 (1.85)	
TDF + ABC/DDI/3TC/ FTC + LPV/r		12 (66.67)
AZT + 3TC/ABC + LPV/r		4 (22.22)
ABC + DDI + DRV/r		1 (5.56)
DDI + 3TC + IDV/r		1 (5.56)
ART times (mo)		
12	11 (20.37)	
12–24	10 (18.52)	3 (16.67)
>24	33 (61.11)	15 (83.33)
Drug resistance		
NRTIs	1 (1.85)	1 (5.56)
NNRTIs	5 (9.26)	2 (11.11)
NRTIs + PI/r		4 (22.22)
NNRTIs + NRTIs	31 (57.41)	7 (38.89)
All drugs	2 (3.70)	2 (11.11)
Any drug	15 (27.78)	2 (11.11)

^a VL, viral load; AZT, zidovudine; 3TC, lamivudine; FTC, emtricitabine; d4T, stavudine; NVP, nevirapine; EFV, efavirenz; DDI, didanosine; TDF, tenofovir; ABC, abacavir; LPV/r, lopinavir/ritonavir; DRV/r, darunavir/ritonavir; IDV/r, indinavir/ritonavir.

NVP; 54/72 patients; 75%) (where a slash [/] indicates that either EFV or NVP was used), and the second-line therapy was NRTIs plus a protease inhibitor (NRTIs-PI/r; 19/73; 25%).

Phylogenetic analyses. As indicated in Materials and Methods, sequences were aligned with HIV-1 references and also with sequences from ART-naïve patients who were included in the ISAARV cohort and collected since 1997 or who were diagnosed as newly infected since 2003 (not shown). These sequences were used to report on resistance mutations in naïve patients from Senegal by Diop-Ndiaye et al. (1). Also, some of the earliest samples from the ISAARV cohort were used to document, for one of the first times, the minor mutations in non-B subtypes (15). Our goal was to check any duplicate patient samples between the ART-naïve patient samples and the 72 samples from the present study to avoid any sequence overlap in database accessions. We found five patients who were previously included in the above studies under accession numbers FN599718, FN599740, FN599686, FN599697, and AJ286986. However, 7 to 10 years later, the patients harbored several drug resistance mutations and consequently, we submitted the corresponding sequences.

The overall subtype distribution was as follows: CRF02_AG



FIG 1 Maximum-likelihood tree depicting the phylogenetic relationships between the sequences in this study. The tree was constructed as indicated in Materials and Methods. alRT statistics were used to support the tree topology and are indicated on the main branches. The letter Ψ indicates a very probable transmission chain between two sequences collected from one man and one woman. Asterisks indicate unique recombinant strains. HIV-1 reference sequences from the Los Alamos database are indicated by dashed lines, and sequences from the present study are indicated by solid lines.

($n = 43$; 59.72%), C ($n = 5$; 6.94%), A3 ($n = 3$; 4.17%), B ($n = 2$; 2.78%), D ($n = 2$; 2.78%), CRF06_cpx ($n = 4$; 5.56%), and one each of the CRF09_cpx and CRF01_AE strains (1.39%). In addition, 11 unique recombinant forms (URFs) were also found, including CRF02_AG/A3 ($n = 3$; 4.17%), CRF02_AG/A ($n = 2$; 2.78%), and one (1.39%) each of CRF02_AG/CRF06_cpx, CRF02_AG/U/CRF02_AG, CRF09_cpx/CRF02_AG, G/CRF02_AG/A, CRF02_AG/C/A, and CRF11_cpx/CRF02_AG. Unique recombinants with the same profile, i.e., CRF02_AG/A3 and CRF02_AG/A, did not cluster together in the phylogenetic tree. Figure 1 shows the phylogenetic relationships between the sequences in the present study. We found one very probable transmission chain between two strains originating from one man and one woman.

Drug resistance analysis. Table 1 summarizes the findings on drug resistance mutations among the 72 HIV-1-infected patients known to have experienced virological failure ($\geq 3 \log_{10}$ copies/ml) during first-line ($n = 54$) and second-line ($n = 18$) ART. The first-line therapeutic regimen was NRTIs-EFV/NVP (54/72; 75%), and the second-line therapy was NRTIs-PI/r (18/72; 25%). Fifty-five patients (55/72; 76.39%) had at least one drug resistance mutation. The drug resistance rates were 72.22 and 88.89% for the first- and second-line ARTs, respectively. For patients on the first-line ART, the high rate of resistance mutations was associated with NRTI-NNRTI combinations ($n = 31$; 57.41%). However, the rates of resistance mutation with second-line ART were 38.89 and 22.22% with the NRTI-NNRTI and NRTI-PI/r combinations, respectively.

For NRTI mutations (Table 2), the CRF02_AG strain contained all of the mutations associated with resistance to NRTIs, except the K65R mutation. However, the subtypes B, CRF09_cpx, CRF02_AG/CRF06_cpx, and CRF09_cpx/CRF02_AG displayed no mutations associated with resistance to NRTIs. Among the mutations associated with resistance to NRTIs (126 mutations), we observed a predominance of TAMs ($n = 64$) which was equivalent to 50.79% of the set. We also observed a high rate of mutations at the M184 position, which represents 44 (34.92%) of the

TABLE 2 Mutations in the RT gene at key positions associated with NRTI resistance*

Subtype	No. of strains	M41	D67	K70	L210	T215	K219	K65	L74	Y115	M184	E44	V118	69
A3	3													V ₁
B	2													
C	5													V ₄
CRF01_AE	1						A ₁ , F ₁	E ₁						V ₁
CRF02_AG	43	L ₇	N ₁₀ , G ₁	R ₉ , K/N ₁₃	W ₄	Y ₁₀ , F ₉ , I ₁₃	E ₄ , Q ₃ , N ₁	V ₃	F ₁					N ₁
				G/R ₁₃ , G ₁		S/Y ₁₁ , I/V ₁								P/T ₁
CRF02_AG/A	2	L ₁												V ₂
CRF02_AG/A3	3													V ₃
CRF02AG/CRF06_cpx	1													
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1		N ₁				Q ₁							V ₁
CRF06_cpx	4													V ₂
CRF09_cpx	1			—										
CRF09_cpx/CRF02_AG	1													
D	2		N ₁	R ₁			Q ₁							V ₁
G/CRF02_AG/A	1	L ₁			W ₁			I ₁						V ₁
CRF02_AG/C/A	1							R ₁	F ₁					V ₁
CRF11_cpx/CRF02_AG	1					S/Y ₁								V ₁
Total	72	9	11	9	5	19	11	1	5	2	44	3	4	3

* For example, in V₂, the letter represents the amino acid substitution and the number indicates the number of strains with that mutation.

TABLE 3 Mutations in the RT gene at key positions associated with NNRTI resistance^a

Subtype	No. of strains	L100	K101	K103	V106	V108	Y181	Y188	G190	P225
A3	3		P ₁ , E ₁	N ₁		I ₁			A ₁	
B	2			N ₁						
C	5			N ₂					A ₂	
CRF01_AE	1					C ₁	C ₁			
CRF02_AG	43	I ₂		N ₂₁		I ₇	C ₁ , C/Y ₁	L ₂	A ₃ , A/G ₁	H ₃
CRF02_AG/A	2			N ₂			C ₁			H ₂
CRF02_AG/A3	3			N ₁						
CRF02_AG/CRF06_cpx	1									
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1			N ₁						
CRF06_cpx	4			N ₁			C ₁			
CRF09_cpx	1									
CRF09_cpx/CRF02_AG	1									
D	2									
G/CRF02_AG/A	1			N ₁		I ₁				
CRF02_AG/C/A	1						C ₁		L ₁	
CRF11_cpx/CRF02_AG	1									
Total	72	2	2	31		10	6	3	7	5

^a For example, in N₁, the letter represents the amino acid substitution and the number indicates the number of strains with that mutation.

total of 126 mutations. The CRF02_AG form also displayed mutational combinations, including several cases of TAMs-M184V, two cases of TAMs and an insertion at position 69, three cases of TAMs-E44D, and five cases of M184V-L74V. The M184V mutation was also found in only two variants.

Table 3 displays all of the mutations in our study population that are associated with resistance to NNRTIs. The CRF02_AG strains showed all of the mutations associated with resistance to NNRTIs, except mutations at positions K101P/E and V106I. The subtype D, URFs (CRF09_cpx/CRF02_AG, CRF11_xpx/CRF02_AG, and CRF02_AG/CRF06_cpx) and CRF09_cpx contained any mutations that were associated with resistance to NNRTIs. In addition, we observed a predominance of mutations at position K103N (31/67; 46.27%), followed by additional mutations at positions V108, G190, and Y181. Several cases of K103N combined with other mutations (e.g., L100I and P225H) were noted. The mutation K103N was also found once in each of 10 patients.

In contrast to the high rate of mutations associated with resistance to NRTIs and NNRTIs, there were few mutations associated with PI/r resistance. We documented 25 positions of mutations among 57 HIV-1-infected patients who developed this type of resistance. Several cases of mutations were found with a predominance of the M46I and L76V/E mutation types, and each represented 24% of the total. The CRF01_AE and CRF02_AG strains harbored most of the mutational positions. One subtype D and one URF (G/CRF02_AG/A) developed two mutations, at positions I50 and L76 and positions M46 and I84, respectively. Subtypes A3, B, C, and D, CRF06_cpx, CRF09_cpx, and the URFs (CRF02_AG/A, CRF02_AG/A3, CRF02_AG/CRF06_cpx, CRF02_AG/U/CRF02_AG, CRF09_cpx/CRF02_AG, CRF02_AG/C/A, and CRF11_cpx/CRF02_AG) contained any mutations associated with PI/r resistance.

DISCUSSION

In this study, we investigated the prevalence of HIV-1 drug resistance mutations and the genetic variability among Senegalese patients undergoing HAART in the public health system. This work

is in contrast to structural prospective studies, as we conducted a cross-sectional study of 72 patients with known virological failure ($\geq 3 \log_{10}$ copies/ml) while undergoing treatment. This study identified a predominance of the CRF02_AG strains (43/72, 59.72%), the circulation of eight subtypes/CRFs, and 11 URFs, representative of a very high level of genetic diversity, in accordance with previously published studies (16). However, the subtype/CRF distribution can change over time in some high-risk groups, such as female sex workers (3). A very high level of genetic diversity with a substantial number of URFs and an increased prevalence of subtype C strains was previously described in untreated Senegalese patients from 1998 to 2007 (1).

In a structural cohort in Senegal, an increase in AIDS-defining illnesses was noted in patients with immunological and virological failure or with only virological failure (17). Studies in Senegal have demonstrated a low rate of drug resistance mutations in patients in a structural cohort (6, 12, 13). In the present study, we examined patients from the public health system and found a high rate of drug resistance mutations: 76.39% of the samples tested (55/72) had at least one drug resistance mutation after a median follow-up period of 40 months. This rate of drug resistance mutation is similar to that recently reported in studies in decentralized areas of Senegal (18) and in other countries such as the Central African Republic (19) and the Republic of South Africa using the same first-line regimens (20). In contrast, a relatively low prevalence of resistant viruses has been reported in Cameroon after 12 and 24 months, probably because of the shorter median follow-up period of 17 months (21). The drug resistance rates among patients with virological failure were 72.22 and 88.89% for first- and second-line ART, respectively. For patients on first-line ART, the highest rate of resistance mutations was associated with a combination of NRTIs-NNRTIs ($n = 31$; 57.41%). This finding confirms the need to increase the number of patients on second-line ART, but the financial cost is higher than that of the first-line drugs (22). At sites with viral load monitoring, the patients are switched earlier than at sites without viral load monitoring (23). While expensive, viral load monitoring has the potential to save costs on expensive second-line drugs by confirming that they are needed (7). However,

TABLE 4 Mutations in the protease gene at key positions associated with resistance to PI/r^a

Subtype	No. of strains	V32	D30	M46	I47	G48	I50	I54	Q58	T74	L76	V82	I84	N88	I90
A3	3														
B	2														
C	5														
CRF01_AE	1				I ₁	V ₁		V ₁							
CRF02_AG	43				I ₄	V ₂			V ₃			V ₂	V ₄		M ₁
CRF02_AG/A	2														
CRF02_AG/A3	3														
CRF02_AG/CRF06_cpx	1														
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1														
CRF06_cpx	4														
CRF09_cpx	1														
CRF09_cpx/CRF02_AG	1														
D	2							A ₁			F ₁				
G/CRF02_AG/A	1				I ₁								V ₁		
CRF02_AG/C/A	1														
CRF11_cpx/CRF02_AG	1														
Total	72		6	3		2	3		3	6		1		1	

^a For example, in I₁, the letter represents the amino acid substitution and the number indicates the number of strains with that mutation.

the rates of resistance mutations for second-line ART were 36.84 and 21.05% with combinations of NRTIs-NNRTIs and NRTIs-PI/r, respectively. This high level of patients who harbored resistance to NRTIs-NNRTIs was due to the re-emergence of archived mutations as a result of failure of first-line ART with NRTI- or NNRTI-containing regimens. These results showed a high rate of HIV-1 drug resistance among patients undergoing first- and second-line therapeutic regimens, while third-line regimens are more expensive and not yet available in our countries. The main solution for those patients resistant to both first- and second-line regimens is to use another boosted PI/r and etravirine, a second-generation NNRTI (13). In the public health system, as ART availability continues to increase throughout Africa, the monitoring of HIV drug resistance mutations should be a priority (24). In Senegal, a total of 18,352 patients were undergoing HAART from 1998 to 2011 ([http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report[1].pdf)) and the few data available showed a high rate of HIV-1 drug resistance among treated patients (18). HIV infection cohorts should have an excellent and important platform to preserve current first-line drugs for the long term. There is also a need for some form of cheap and practical viral load monitoring and drug resistance testing for urban and rural environments in resource-limited settings (24, 25).

As mentioned in Tables 2 and 3, the CRF02_AG strains harbored all of the mutations associated with resistance to NRTIs, except the K65R mutation, and all of the mutations associated with resistance to NNRTIs, except those at positions K101P/E and V106I. Most of the mutated positions associated with PI/r resistance (Table 4) were harbored by the CRF01_AE and CRF02_AG viruses. These findings indicate that the rate of antiretroviral drug resistance mutation selection appears to be influenced by viral genetic diversity, as previously observed (26), despite the fact that the prevalence of patients carrying the CRF02_AG strain was higher than that of patients in the study set carrying other subtypes, CRFs, and URFs. Mutations associated with NRTI, NNRTI, and PI/r resistance have already been reported in CRF02_AG strains from Burkina Faso (26).

Among the mutations associated with resistance to NRTIs, we observed a predominance of TAMs ($n = 64$; 50.79%), followed by the M184V/I mutation, which represents 44 (34.92%) of the total of 126. The higher rate of TAMs and the M184V/I mutation observed in this study has previously been described in Malawi and could be related to the duration of treatment failure before genotyping in patients being treated in a public health system (27). A high rate of TAM accumulation in patients with immunological or clinical failure in response to WHO-recommended treatment has also been described in South Africa (28), and it is higher than that observed in the Central Africa Republic (24%). These treatment guidelines may also be associated with a higher frequency of the M184V mutation, conferring increased sensitivity to zidovudine (AZT) and stavudine (d4T) (29). CRF02_AG strains also revealed several cases of mutational combinations of TAMs and M184V, two cases of TAMs plus an insertion at position 69, three cases of TAMs plus E44D, and five cases of M184V plus L74V. The M184V mutation was also found solely in CRF06_cpx. These mutations have been identified in limited-resource settings, where the first-line regimen drugs contained AZT or d4T (28). The M184V mutation alone does not significantly affect the *in vivo* virological responses to abacavir (ABC) (30). In adults infected with HIV-1 subtype B, the M184V mutation in the presence of additional TAMs increased the susceptibility to AZT (31). Furthermore, this mutation has been demonstrated to delay the emergence of TAMs, suggesting that it would remain advantageous to maintain emtricitabine (FTC)-containing treatment even for patients with a detectable viral load (32). The presence of amino acid insertions at codon 69 generally occurred in the presence of multiple TAMs, as observed in this study. The combination of TAMs plus an insertion at position 69 is associated with intermediate resistance to lamivudine (3TC) and FTC and high-level resistance to each of the remaining NRTIs (33). The E44D mutation may have an accessory role in increasing resistance to NRTIs in the presence of TAMs (34). The presence of the L74V mutation in combination with the M184V mutation is enough to get high-level resistance to both ABC and didanosine (DDI) (35).

For resistance to NNRTIs, we have reported a predominance of

K103N mutations (31/67; 46.27%), followed by mutations at positions V108, Y181, and K101. A higher prevalence of the K103N mutation and resistance to NNRTIs have also been observed after 24 months of first-line ART treatment in adults in Bangui (19). The Y181C mutation confers high-level resistance to nevirapine (36). However, combined with the K103N mutation or K103N/V108I, it may confer significant cross-resistance to all of the currently approved NNRTIs (37). Several cases of combination of the K103N mutation with another mutation, such as L100I or P225H, have been reported and resulted in lower susceptibility and a poorer virologic response than the K103N mutation alone (38).

In contrast to the high rate of mutations associated with resistance to NRTIs and NNRTIs, there are only a few mutations associated with PI/r resistance. The antiretroviral regimens based on boosted PI/r might be a better alternative to NNRTI-based regimens when patient compliance is imperfect and viral load monitoring is infrequent, as in many HIV programs conducted in resource-limited settings (39). We identified mutations at 25 positions among the 57 HIV-1-infected patients who developed resistance to PI/r, with a predominance of the M46I and L76V/E mutations, each representing 24% of the total. These common mutations have been associated with a decrease in susceptibility to lopinavir (LPV)/ritonavir and indinavir (IDV)/ritonavir but an increase in susceptibility to atazanavir and saquinavir (40).

Despite the low number of genotyped samples, this study points out the problem of the high prevalence of HIV-1 drug resistance and the high rate of TAMS when viral load monitoring is not done regularly. These findings emphasize the need to improve the monitoring of ART in resource-limited settings.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Health through the National Division against AIDS and STI, the CHAIN project.

We thank all of the people who directly or indirectly contributed to the successful completion of this study.

We have no competing interests.

REFERENCES

- Dlop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Leye N, Ngom-Gueye NF, Montavon C, Peeters M, Mboup S. 2010. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naïve patients from Senegal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26:1133–1138.
- Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndiaye 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.
- Hamel DJ, Sankale JL, Elsen G, Meloni ST, Mullins C, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Kanki PJ. 2007. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23:1189–1196.
- Ndiaye HD, Toure-Kane C, Vidal N, Nlama FR, Nlang-Diallo PA, Dleye T, Gaye-Diallo A, Wade AS, 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.
- Tournoud M, Etard JF, Ecochard R, DeGruttola V. 2010. Adherence to antiretroviral therapy, virological response, and time to resistance in the Dakar cohort. *Stat. Med.* 29:14–32.
- Laurent C, Diakhaté N, Gueye NF, Toure MA, Sow PS, Faye MA, Gueye M, Lanlée I, Toure Kane C, Llégeols F, Vergne I, Mboup S, Badiane S, Ndiaye I, Delaporte E. 2002. The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study. *AIDS* 16:1363–1370.
- World Health Organization. 2010. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach: 2010 revision. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/>.
- Vergne I, Kane CT, Laurent C, Diakhaté N, Gueye NF, Gueye PM, Sow PS, Faye MA, Llégeols F, Ndir A, Lanlée I, Peeters M, Ndiaye I, Mboup S, Delaporte E. 2003. Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS* 17:S31–S38.
- Cozzi-Lepri A, Phillips AN, Martinez-Picado J, Monforte A, Katlama C, Eg Hansen AB, Horban A, Brunet J, Clotet B, Lundgren JD, EuroSIDA Study Group. 2009. Rate of accumulation of thymidine analogue mutations in patients continuing to receive virologically failing regimens containing zidovudine or stavudine: implications for antiretroviral therapy programs in resource-limited settings. *J. Infect. Dis.* 200:687–697.
- Kantor R, Shaffer RW, Follansbee S, Taylor J, Shlame D, Hurley L, Nguyen DP, Katzenstein D, Fessel WJ. 2004. Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy. *AIDS* 18:1503–1511.
- Hossenpflug MC, van Oosterhout JJ, Welgel R, Philt S, Kamwendo D, Parkin N, Flscus SA, Nelson JA, Eron JJ, Kumwenda J. 2009. The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy. *AIDS* 23:1127–1134.
- Laurent C, Ngom Gueye NF, Ndour CT, Gueye PM, Diouf M, Diakhaté N, Toure Kane NC, Lanlée I, Ndir A, Vergne I, Ndiaye I, Mboup S, Sow PS, Delaporte E, ANRS 1215/1290 Study Group. 2005. Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38:14–17.
- Wallis C, Mellors J, Venter W, Sanne I, Stevens W. 2009. Protease inhibitor resistance is uncommon in patients on failing second-line lopinavir/r-containing regimen in South Africa. *Antivir. Ther.* 14(Suppl 1):A183.
- 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.
- Vergne I, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeols A, Llégeols 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.
- 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.* 16:1525–1531.
- De Beaudrap P, Etard JF, Diouf A, Ndiaye I, Ndeye GF, Sow PS, Ndeye KC, Ecochard R, Delaporte E, ANRS 1215 Study Group. 2010. Incidence and determinants of new AIDS-defining illnesses after HAART initiation in a Senegalese cohort. *BMC Infect. Dis.* 10:179.
- Diouara AAM, Kebe K, Dlop-Ndiaye H, Thiam M, Leye N, Diallo S, Thlackpe E, Diallo A, Faye M, Sakine M, Ouattara B, Diouf S, Toure-Kane C, Mboup S. 2011. Apport du papier bouvard dans le génotypage du VIH-1 en milieu décentralisé au Sénégal, WEAA0504. 16ème Conférence Internationale sur le Sida et les IST en Afrique, Addis Abeba, Ethiopie.
- Père H, Charpentier C, Mbelloso P, Dandy M, Matta M, Moussa S, De Dieu Longo J, Grésenguet G, Abraham B, Beléz 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.
- El-Khatib Z, Ekström AM, Ledwaba J, Mohapi L, Laher F, Karstaedt K, Charalambous S, Petzold M, Katzenstein K, Lynn M. 2010. Viremia and drug resistance among HIV-1 patients on antiretroviral treatment: a cross-sectional study in Soweto, South Africa. *AIDS* 24:1679–1687.
- Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeols A, Koulla-Shiro S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M, Delaporte E. 2009. Low levels of antiretroviral-resistant HIV infection in a routine clinic in Cameroon that uses the World Health Organization (WHO) public health approach to monitor antiretroviral treatment and adequacy with the WHO recommendation for second-line treatment. *Clin. Infect. Dis.* 48:1318–1322.
- Long L, Fox M, Sanne I, Rosen S. 2010. The high cost of second-line antiretroviral therapy for HIV/AIDS in South Africa. *AIDS* 24:915–919.
- ART-LIC of leDEA Study Group, Kelser O, Tweya H, Bouillé A, Bräutigam P, Schecter M, Brinkhof MW, Dabis F, Tubal S, Sprinz E, Pujades-Rodríguez M, Calmy A, Kumarasamy N, Nash D, Jahn A,

- MacPhail P, Lüthy R, Wood R, Egger M. 2009. Switching to second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: comparison of programmes with and without viral load monitoring. *AIDS* 23:1867–1874.
24. Price M, Wallis CL, Lakhia S, Karita E, Kamali A, Anzala O, Sanders EJ, Bekker LG, Twesigye R, Hunter E, Kaleebu P, Kayitenkore K, Allen S, Ruzagira E, Mwangome M, Mutua G, Amornkul PN, Stevens G, Pond SL, Schaefer M, Papathanasopoulos MA, Stevens W, Gilmore J, IAVI Early Infection Cohort Study Group. 2011. Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:5–12.
 25. Phillips A, Pillay D, Miners AH, Bennett DE, Gilks CF, Lundgren JD. 2008. Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model. *Lancet* 371:1443–1451.
 26. Brenner BG. 2007. Resistance and viral subtypes: how important are the differences and why do they occur? *Curr Opin HIV AIDS* 2:94–102.
 27. Wallis CL, Mellors JW, Venter WD, Sanne I, Stevens W. 2010. Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53:480–484.
 28. Marconi VC, Sunpath H, Lu Z, Gordon M, Koranteng-Apeagyei K, Hampton J, Carpenter S, Giddy J, Ross D, Holst H, Losina E, Walker BD, Kuritzkes DR, South African Resistance Cohort Study Team. 2008. Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis* 46:1589–1597.
 29. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. 2002. The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76:3248–3256.
 30. Katlama C, Clotet B, Plettenberg A, Jost J, Arasteh K, Bernasconi E, Jeantils V, Cutrell A, Stone C, Alt-Khaled M, Purdon S. 2000. The role of abacavir (ABC, 1592) in antiretroviral therapy-experienced patients: results from a randomized, double-blind, trial. CNA3002 European Study Team. *AIDS* 14:781–789.
 31. Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269:696–699.
 32. Alt-Khaled M, Rakik A, Griffin P, Cutrell A, Fischl MA, Clumeck N, Greenberg SB, Rubio R, Peters BS, Pulido F, Gould J, Pearce G, Spreen W, Tisdale M, Lafon S, CNA3003 International Study Team. 2002. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase during therapy with abacavir, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected adults with no prior antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 7:43–51.
 33. Prado JG, Franco S, Matamoros T, Rutz L, Clotet B, Menéndez-Arias L, Martínez MA, Martínez-Picado J. 2004. Relative replication fitness of multi-nucleoside-analogue-resistant HIV-1 strains bearing a dipeptide insertion in the fingers subdomain of the reverse transcriptase and mutations at codons 67 and 215. *Virology* 326:103–112.
 34. Romano L, Venturi G, Bloor S, Harrigan R, Larder BA, Major JC, Zazzi M. 2002. Broad nucleoside-analogue resistance implications for human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase mutations at codons 44 and 118. *J Infect Dis* 185:898–904.
 35. Whlcomb JM, Parkin NT, Chappay C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. 2003. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* 188:992–1000.
 36. Casado JL, Hertogs K, Rutz L, Dronda F, Van Cauwenbergh A, Arnó A, García-Arata I, Bloor S, Bonjoch A, Blazquez J, Clotet B, Larder B. 2000. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. *AIDS* 14:F1–7.
 37. Bacheler L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, Cordova B, Hertogs K, Larder B, Buckley R, Baker D, Gallagher K, Scarnati H, Tritch R, Rizzo C. 2001. Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol* 75:4999–5008.
 38. Scherrer AU, Hasse B, von Wyl V, Yerly S, Böni J, Bürgisser P, Klimkait T, Bucher HC, Ledermann B, Günthard HF. 2009. Prevalence of etravirine mutations and impact on response to treatment in routine clinical care: the Swiss HIV Cohort Study (SHCS). *HIV Med* 10:647–656.
 39. Adlington R, Richens J, Shahmanesh M. 2009. First-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: time to reconsider? *J Infect Dis* 199:1407–1408.
 40. Young TP, Parkin NT, Stawiski E, Pilot-Matias T, Trinh R, Kempf DJ, Norton M. 2010. Prevalence, mutation patterns, and effects on protease inhibitor susceptibility of the L76V mutation in HIV-1 protease. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4903–4906.

Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on January 25, 2013 by Mousa THIAM

Article 3 :

Thiam M, Diop-Ndiaye H, Kebe K, Vidal N, Diakhate-Lô R, Diouara AA,
Leye N, Ndiaye O, Sow A, Ngom-Gueye NF, Mboup S, Toure-Kane C.

**Performance of the ViroSeq HIV-1 genotyping system v2.0 on HIV-1
strains circulating in Senegal.** *J Virol Methods.* 2013, 188 (1-2): 97-103.

II.3. Evaluation des performances d'une technique génotypique : le ViroSeq, face à la variabilité génétique des souches de VIH-1 qui circulent au Sénégal

II.3.1. Problématique

La caractérisation des mutations associées à une résistance du VIH-1 aux ARV a été développée à partir des souches de VIH-1, sous-type B et spécifiquement pour les techniques commerciales, à savoir le Trugene HIV-1 genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) et le ViroSeq HIV-1 Genotyping System V2.0 (Celera, Alameda, Californie, USA). L'utilisation de ces techniques sur les souches de VIH-1 non-B, nécessite une évaluation, à la différence des techniques maison qui sont plus spécifiques sur ces dernières (**Chen et coll., 2007**). L'étude des résistances aux ARV, qui a accompagné le programme ISARRV, avait commencé depuis 2003 avec les techniques « maison » de génotypage comme celle de l'ANRS AC 11 (<http://www.hivfrenchresistance.org/>). A partir de 2009, avec l'accréditation du laboratoire de Bactériologie et Virologie, comme laboratoire de référence pour le monitoring des résistances du VIH-1 aux ARV utilisant le ViroSeq, cette dernière a commencé à être utilisée. Cependant, l'utilisation de cette technique est souvent confrontée à des reprises et des échecs d'amplification et/ou de séquençage, ce qui nous mène à utiliser une autre technique alternative pour rendre un rapport de résistance. Les performances du ViroSeq ont été démontrées sur des souches de VIH-1 sous type B (**Cunningham et coll., 2001**), non-B et des recombinants (**Mracna et coll., 2001**). Tout récemment, une étude qui a été menée au Cameroun, a montré que ces performances peuvent être influencées par des différences de polymorphisme entre les sous type B et non-B (**Aghokeng et coll., 2011**).

II.3.2. Objectif

L'objectif de cette étude consistait à évaluer les performances du ViroSeq HIV-1 Genotyping System V2.0 au niveau des souches de VIH-1 qui circulent au Sénégal.

II.3.3. Méthodologie

➤ Population d'étude, Charge virale et étude de résistance

L'étude a porté sur 150 échantillons provenant de 98 patients naïfs de tout traitement ARV et 52 patients sous ARV. Un prélèvement de sang total a été effectué sur tube EDTA chez ces patients suivis au niveau des sites cliniques de Dakar. L'étude a été approuvée par le comité

éthique du gouvernement Sénégalais. Les échantillons ont été sélectionnés sur la base d'une CV > 3 log₁₀ copies/ml, déterminée par la technique de Abbott RealTime HIV-1 m2000rt (Abbott Laboratories, Chicago, IL). L'étude des mutations de résistance a été effectuée en utilisant la technique du ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2.0. Après extraction, l'ARN plasmatique est amplifié par réaction de rétrotranscription, suivie d'une seule étape de PCR pour générer un ADN double brin de 1800 paires de bases. Les produits de PCR seront ensuite purifiés et séquencés grâce à l'ABI 3100-Avant avec la technique des terminateurs de chaîne. Le séquençage des produits de PCR a été effectué sur la totalité de la protéase et 320 premiers acides aminés de la transcriptase inverse. Pour le séquençage, le kit utilise sept amorces dont quatre sens (A, B, C et D) et trois anti-sens (F, G et H). L'amorce D a été rajouté dans le kit pour suppléer l'amorce A en cas d'échec. Les séquences ont été ensuite analysées avec le logiciel ViroSeq HIV-1 Genotyping Systel v2.8 (Celera Diagnostic, San Francisco, CA) afin de générer un rapport de résistance. En cas d'échec d'amplification et/ou de séquençage après des reprises, utilisant le kit du ViroSeq, la technique « maison » de l'ANRS AC 11 a été utilisée (<http://www.hivfrenchresistance.org/>). Les séquences générées avec cette dernière technique, ont été soumises dans la base de données de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) afin de générer un rapport de résistance.

➤ Analyse phylogénétique

La détermination des différents sous-types, CRFs/URFs présents dans la population d'étude a été effectuée en utilisant la méthode du plus proche voisin avec un bootstrap de 100 grâce au ClustalX v.1.8.3. L'ensemble des sous-types purs et CRFs qui circulent en Afrique de l'Ouest et disponibles dans la base de données de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>), a été inclus dans l'analyse phylogénétique. La présence d'éventuels recombinants a été confirmée par bootscanning avec le Simplot v.3.5.1. Afin d'identifier toutes différences de polymorphisme au niveau de la région probable de fixation de chaque amorce de séquençage, pouvant influencer leur performance, les séquences générées, ont été analysées en ligne avec SeqPublish et Sequence Locator dans Los Alamos. Des séquences VIH-1, sous-type B incluant le HXB2 (accession N° : KO3455) ont été utilisées comme références. L'identification de ces régions probables de fixation des différentes amorces dans la partie *gag-pol*, a été basée sur une première estimation effectuée par Aghokeng et collaborateurs (**Aghoken et coll., 2011**).

II.3.4. Résultats

➤ Caractéristique de la population d'étude

La population d'étude était composée de 96 femmes et 54 hommes, soit un sexe ration de 0.7 et l'âge médian était de 39 ans [20-70]. Les charges virales médianes étaient de $5,12 \log_{10}$ [3,01-6,55] et $4,75 \log_{10}$ [3,12-6,13] copies/ml respectivement chez les 98 naïfs et les 52 sous ARV. Parmi les 98 naïfs, un seul cas de mutation de résistance primaire a été noté à la position V108I et conférant une résistance aux INNTIs. Chez les 52 sous ARV, nous avions une 1^{ière} ligne avec INTI+EFV/NVP (37/52, 71,15%) et une 2^{nde} ligne constituée de INTI+IP/r (15/52, 28,85%). Parmi ces patients, 41/52, soit 78,88% ont développé au moins une mutation de résistance aux ARV. Sept patients ont eu des résistances pour une seule classe dont 2,4% aux INTIs et 14,6% pour les INNTIs. Vingt huit patients ont développé des résistances à deux classes avec 68,3% (INTI+INNTI) et 7,3% (INTI+IP/r) et enfin, 7,3% ont eu des mutations de résistance aux trois classes thérapeutiques.

➤ Analyse phylogénétique

La diversité génétique de cette population est caractérisée par la prédominance du CRF02_AG (88/150, 58,7%), 11 autres sous-types/CRFs : C (16/150, 10,7%), A3 (10/150, 6,7%), B (4/150, 2,7%) et CRF06_cpx (4/150, 2,7%), G (3/150, 2,0%), CRF09_cpx (2/150, 1,3%), D (2/150, 1,3%), CRF01_AE, CRF49_cpx, K et CRF45_cpx représentant chacun 1/150, soit 0,7%. Nous avions aussi trouvé 16 URFs et une séquence non classée parmi les différents sous-types et CRFs connus.

➤ La performance des amorces et la diversité génétique

Le résultat d'une amorce est considéré positif, si nous avons une séquence de bonne qualité couvrant la région définie. Cependant, ce résultat est négatif si la région voulue n'est pas bien amplifiée ou quand la séquence n'est pas de bonne qualité. Les taux d'amplification et de séquençage sont respectivement 98% (147/150) et 96,6% (142/147). Les 8 échantillons non amplifiés et/ou non séquencés par le ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2.0 ont été analysés avec la technique « maison » de l'ANRS. Leur analyse phylogénétique a montré : CRF02_AG (n=4), A3 (n=2) CRF49_cpx (n=1) et un URF (CRF02_AG/A3).

Toutes les informations relatives à la performance des différentes amorces sur les échantillons testés, sont ainsi représentées dans le tableau XII ci-dessous.

Tableau XII : Performance des amores du ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 sur les différents sous-types, CRFs and URFs

VIH-1 Sous-types/CRF/URF	N	% d'échec de chaque amorce																		
		A			B			C			D			F			G			
		E	S	%	E	S	%	E	S	%	E	S	%	E	S	%	E	S	%	
A3	9	1	8	11.11	0	9	0	0	9	0	7	2	77.78	3	6	33.33	0	9	0	
B	4	0	4	0	0	4	0	0	4	0	1	3	25	0	4	0	0	4	0	
C	16	3	13	18.75	0	16	0	0	16	0	15	1	93.75	0	16	0	1	15	6.25	
CRF01_AE	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	100	0	1	0
CRF02_AG	86	6	80	6.98	0	86	0	1	85	1.16	62	24	72.09	6	80	6.98	4	82	4.65	
CRF02_AG/A	2	1	1	50	0	2	0	1	1	50	2	0	100	0	2	0	0	2	0	
CRF02_AG/A3	3	1	2	33.33	0	3	0	0	3	0	3	0	100	1	2	33.33	0	3	0	
CRF02_AG/CRF06_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
CRF02_AG/CRF06_cpx/U	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
CRF02_AG/U	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	100	
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
CRF06_cpx	4	2	2	50	0	4	0	0	4	0	3	1	75	0	4	0	1	3	25	
CRF09_cpx	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0	100	0	2	0	0	2	0	
CRF09_cpx/CRF02_AG	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
CRF36_cpx/CRF02_AG	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
CRF43_02G/G	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
CRF45_cpx	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
CRF49_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	100	
D	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	
G	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	1	2	33.33	0	3	0	0	3	0	
G/CRF02_AG/A	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
G/CRF06_cpx/CRF02_AG/CRF06_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	1	0	0	
K	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
U/A/U/A	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
U/CRF45_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	
Unclassified	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	1	0	100	0	1	0	
Total	147	18	129	12.24	0	147	0	2	145	1.36	105	42	71.43	11	136	7.48	8	139	5.44	
																		12.24		

Amores: A, B, C, D, F, G, H

S = Succès

E = Echec

N = Nombre d'échantillons testés

% = Pourcentage du taux d'échec

Les taux d'échec pour les différentes amores sont : D (105/147, 71,4%), A et H (18/147, 12,2%), F (11/147, 7,5%), G (8/147, 5,4%) et C (2/147, 1,4%). L'amorce B n'a démontré aucun cas d'échec sur l'ensemble des échantillons. L'amorce C est la seconde en termes de performance car elle n'a montré que 1,2% d'échec aux CRF02_AG, plus un seul URF qui est le CRF02_AG/A. Les amores D, A et H ont présenté des taux d'échec élevés, plus particulièrement aux sous-types C et A3 et le CRF02_AG. L'amorce D qui a été conçue pour suppléer l'amorce A en cas d'échec, a présenté les plus importants taux d'échec dont 94% pour le sous-type C, 78% pour le sous-type A3, 72% pour le CRF02_AG et entre 0 et 100% pour les autres sous-types/CRFs/URFs. Pour les 18 échantillons non séquencés par l'amorce A, 5 seulement (5/18, 27,8%) l'ont été avec le D. L'analyse phylogénétique de ces séquences a montré : CRF02_AG (n=2), A3 (n=1) et deux URFs : CRF02_AG/U/CRF02_AG et CRF02_AG/CRF06_cpx/U. Les CRF02_AG et les sous-types C représentent environ les 70% de notre population d'étude. Par conséquent, les taux d'échec élevés des amores A et H, pourrait avoir comme conséquence, un défaut de séquençage de la majorité des échantillons, respectivement au niveau de la protéase et de la transcriptase inverse. Un nombre limité d'échantillons, à savoir B (n=3/4), D (n=3/3) et K (n=1/1), a été parfaitement séquencé par l'ensemble des amores du kit.

Les séquences non amplifiées ou non séquencées par le ViroSeq ont été ensuite comparées d'une part avec des séquences de référence et d'autre part entre elles afin de trouver des différences de polymorphisme pouvant expliquer ces performances différentielles entre amores. Cette analyse visait aussi à voir l'impact du traitement ARV dans la performance des amores de séquençage. Les figures 33, 34 et 35 montrent les différences de polymorphisme entre des sous-types B de référence et 24 séquences de la population d'étude qui sont bien couvertes au niveau des différentes régions probables de fixation des amores A, D et H, qui ont présenté des taux d'échec élevés. Ces régions sont comprises entre les nucléotides 2154-2235, 2238-2304 et 3462-3553 sur le HXB2 respectivement pour les amores A, D et H.

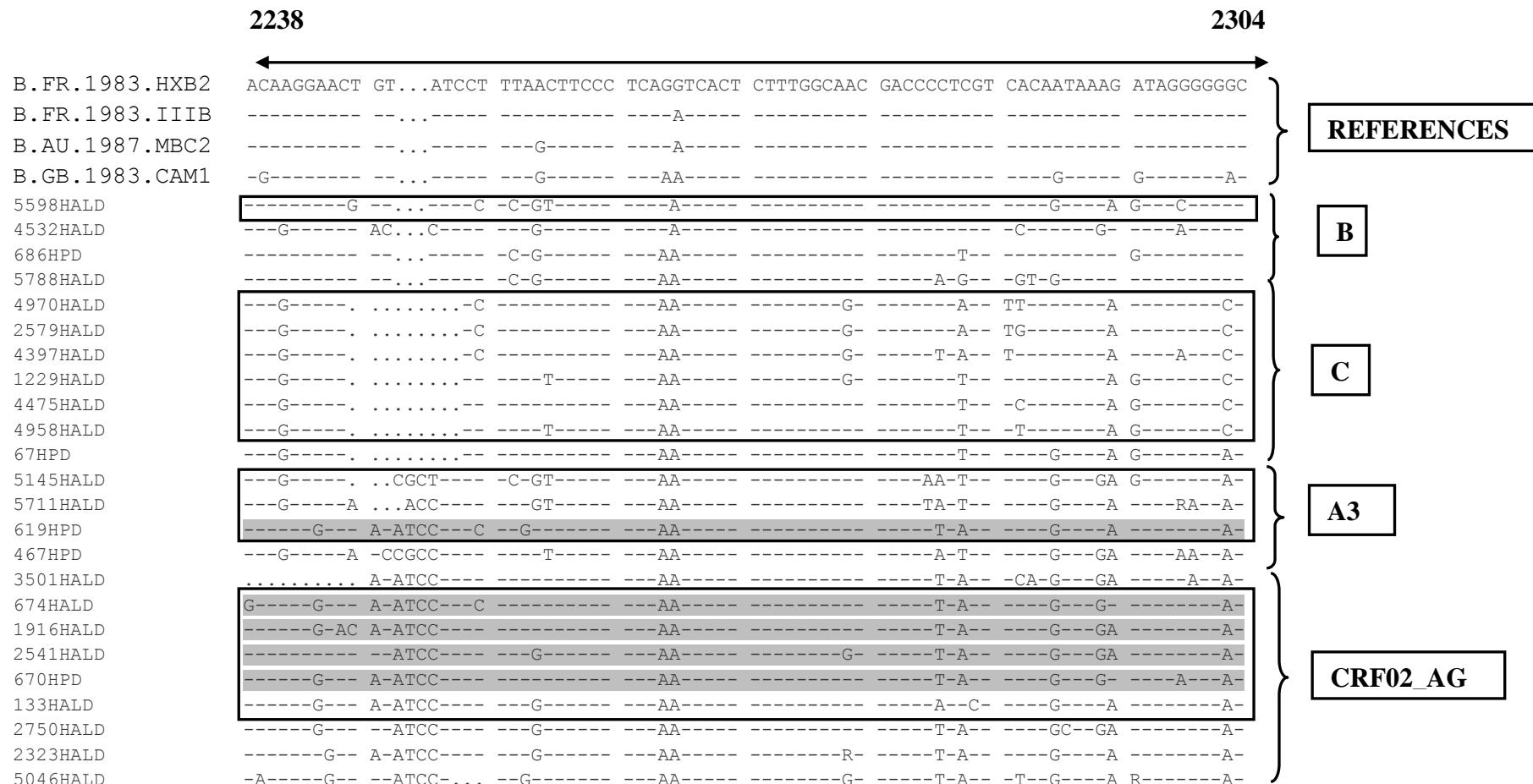
2154-2235 sur HXB2, comme région probable de fixation de l'amorce A

	B.FR.1983.HXB2	AACAGCCCCA	CCAGAAAGAGA	GCTTCAGGTC	TGGGGTAGAG	ACAAACAAC	CCCCTCAGAA	GCAGGAG...	CCGATAG.	ACAAGGAA	
B.FR.1983.IIIB							-T-					
B.GB.1983.CAM1				-T	-A-	-A-	-T-					
B.AU.1986.MBC2		-C-		-T	-A-		-T-					
686HPD				-T	-A-	-G-	-T-		AT--K--			
5598HALD				-T	-AG-A		-T-	A-				
4532HALD		-C-		-T	-AG-		C-	-TT-		-C--		
5788HALD		-G-		-T	-A-		-T-		CTG GGA-AGA-C	AGGAGTCGGG	GG-	
4970HALD	-T	-C-		-A-T	C...-AG		TC-CA	-T-T			CAGAA AG--G--	
4804HALD	-T-	-C-		-T C...	-AG-	G--CC-CG	---GA...		AG-AGA--		CAGGA GG--G--G	
670HPD	-C-	-G-TG-	AT	G-A-A-		-T-G-CT-C-	-T-AA		AG-AGG-A.		CCGAG GG--G-	
133HALD		-C-	--C-G-AAT	G-A-		...C--T-		T-C-----	AAGGAGG-A.		CCGAG GG-----G	
2506HALD	-G	--C----	T-A-GG--AG	G-A--AG--	-T---	...CT --T-		T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGGA GGG-----G	
5616HALD		--C---A-	-----T	C-A-AG--	-TGG-CT-CT	---GA--C-	-G-----				CCGAA GG-A-----	
2541HALD		CG-----	TG--AT	G-A--		TT-CT	---GA...		AG-AGG-A.		CCGAG GG-----G	
674HALD	W	-C-----	T.....	G-A-A	-T	...CT	-T-----	T-----	AAG-AGG-A.		CCGGA GGG-----G	
1916HALD	C	-C-----	TG-A	G-A--	-T	CT-C-	-T-AGA-			G-AGG-A.CCGG...	
5374HALD		-C-----	TT-TG--AT	G-A--	-T	...CT	---	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGAG GG-----G	
5287HALD		-C-----	TG-GT	G-A--	-T-C...	-T	--T-	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGAG GG-----G	
4864HALD		-C-----	A--TG--AT	G-A--	-T-G...	CT	--T-	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGAG GG-----G	
495HALD	-T-----	G	---C-----	TG--A	G-A--		...CT	--T-----	C-C-----	AAG-AGG-A.		CCGGG GG-----G
1953HALD	-W	-----C-----	C-GG--AT	G-A--	-T	...CT	--Y-	T-----	AAG-AGG-A.		GCAGGA GG-----G	
5198HALD		-----C-----	A-GG--AT	G-A--	-T	...CT	--T-----	C-----	AAG-AGG-A.		GCAGGG GG-----G	
4284HALD		-----C-----	TG--AT	G-A--	GTG--	...CT	---CTCTCC	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGAG GG-----G	
4038HALD		-----C-----	TG--AT	G-A--		...C	-T-----	T-C-----	AAG-AGG-A.		TCGGG GG-----G	
4838HALD	-T	-----C-----	TG-GT	G-A--	-T	...CT	--T-----	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCAAG GG-----G	
4866HALD		-----C-----	TG--AT	G-A-G-			--T-----	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCAGA GG-----GG	
4613HALD		-----C-----	TG-GT	G-A--	-T	...CT	--T-----	T-C-----	AAG-AGG-A.		CCGAG AG-----G	

Les sous-types analysés sont mentionnés à droite des figure, les échantillons non séquencés sont encadrés en noir et ceux non amplifiés sont soulignés, ... : Points de gap entre les références et les séquences de la population d'étude, --- : Similitude entre les références et les séquences de la population d'étude, Lettre : Différence de polymorphisme entre les références et les séquences de la population d'étude.

Figure 33 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce A

2238-2304 sur HXB2, comme région probable de fixation de l'amorce D



Les sous-types analysés sont mentionnés à droite des figures, les échantillons non séquencés sont encadrés en noir et ceux non amplifiés sont soulignés, ... : Points de gap entre les références et les séquences de la population d'étude, --- : Similitude entre les références et les séquences de la population d'étude, Lettre : Différence de polymorphisme entre les références et les séquences de la population d'étude.

Figure 34 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce D

3462-3553 sur HXB2, comme région probable de fixation de l'amorce H

	3462	3553
B.FR.1983.HXB2	GAAAACAGAG AGATTCTAAA AGAACCAAGTA CATGGAGTGT ATTATGACCC ATCAAAAGAC TTAATAGCAG AAATACAGAA GCAGGGCAA GG	
B.FR.1983.IIIB	-----	-----
B.GB.1983.CAM1	-----	----- C A -----
B.AU.1986.MBC	----- G - A -----	-----
4532HALD	----- G ----- G ----- C -----	----- G -----
686HPD	----- G ----- G CA -----	----- C -----
5598HALD	----- T G -----	----- G A A -----
5788HALD	----- G G - A ----- G ----- T -----	----- G -----
2750HALD	----- G ----- T ----- CA ----- CA ----- G ----- G A A A A ----- A	
4430HALD	----- G G - A T ----- T A ----- CA ----- G ----- G A A A A ----- A	
2541HALD	----- G G - A ----- T ----- A ----- CA ----- G ----- A A A A ----- A	
5605HALD	----- G G - A GA TA ----- A C ----- A ----- T ----- A A A A ----- A	
323HALD	----- G A Y ----- T ----- A ----- T A ----- G ----- G A A A ----- A	
4867HALD	----- G A ----- G T ----- G A ----- TA ----- G ----- A A A A ----- G A	
674HALD	----- G G ----- W ----- G A ----- CA ----- G ----- A A A A ----- A	
3210HALD	----- G G - A ----- R T ----- G A ----- CA ----- G ----- A A A A ----- A	
4284HALD	----- G G - A ----- T ----- A ----- CA ----- G ----- G A A A ----- A	
2423HALD	----- G G - A A ----- T ----- A ----- A G C ----- G ----- A A A A ----- A	
1916HALD	----- G G - A ----- T ----- A ----- A G ----- A A A -----	
5046HALD	----- G G - A ----- G G ----- A C -----	----- A -----
5616HALD	----- G G - A ----- G G ----- A C -----	----- A -----
MH018	----- T G - A ----- G G A -----	----- A G -----
5711HALD	----- G G ----- C T G ----- G A -----	----- A A ----- A
5145HALD	----- G G ----- G C T G ----- G A -----	----- A A A A ----- A
467HPD	----- G G ----- T C T G ----- G A ----- A G ----- A ----- A	
4806HALD	----- G G - A ----- T ----- C ----- G G C ----- G A A A T ----- A	
5508HALD	----- G G - A ----- C ----- A ----- G G A A A T ----- A	
4928HALD	----- G G ----- G G T ----- C ----- T ----- T ----- T ----- A	

Les sous-types analysés sont mentionnés à droite des figure, les échantillons non séquencés sont encadrés en noir et ceux non amplifiés sont surlignés, ... : Points de gap entre les références et les séquences de la population d'étude, --- : Similitude entre les références et les séquences de la population d'étude, Lettre : Différence de polymorphisme entre les références et les séquences de la population d'étude.

Figure 35 : Alignements comparés entre des sous-types B de référence et 24 séquences non-B au niveau de la région probable de fixation de l'amorce H

L’analyse des figures 33 et 35 ne montre aucune différence de polymorphisme pouvant expliquer pourquoi certains échantillons en échec avec l’amorce A, sont positivement séquencés avec l’amorce D. Parmi les 8 échantillons en échec avec le ViroSeq, 6 provenaient de patients sous ARV ayant développé des mutations de résistance aux INNTIs et aux INTIs. Le niveau de polymorphisme était plus élevé chez les sous-types non-B, comparés aux VIH-1 de sous-type B. Cependant, nous n’avions pas trouvé des différences de polymorphisme (figures 33, 34 et 35) d’une part entre les sous-types non-B de l’échantillonnage et d’autre part entre les échantillons de patients sous ARV, comparés aux autres provenant des naïfs.

II.3.5. Conclusion

Les résultats montrent la nécessité de mieux considérer les souches de VIH-1 non-B dans l’évaluation des tests de génotypage qui sont utilisés dans les régions où circulent ces souches, particulièrement en Afrique de l’Ouest. Ils montrent aussi le besoin de disposer d’une technique alternative, ou d’amorces supplémentaires associées ou non à des changements des conditions spécifiques des PCR pour les VIH-1 non-B qui sont toujours plus ou moins mal séquencés avec le ViroSeq HIV-1 Genotyping System. A coté de la diversité génétique des souches de VIH-1 qui pourrait influencer sur la performance des techniques génotypiques et par conséquent sur le suivi virologique des patients sous ARV, la thérapeutique antirétrovirale à long terme non efficace, due à une mauvaise observance ou à l’acquisition de souches résistantes, peut aussi avoir des conséquences d’ordre virologique. Parmi ces conséquences, nous pouvons citer la surinfection qui est souvent retrouvée chez les populations clés et les couples séroconcordants qui pratiquent des rapports sexuels non protégés (**Blackard et Mayer, 2004 ; Blick et coll., 2007**). La cohorte de l’ANRS 1215, constituée de patients sous HAART pendant plus de 10 ans dont certains formaient des couples séroconcordants, a fait l’objet de la documentation d’un cas de surinfection, constituant ainsi le dernier objectif de ce travail de thèse.



Performance of the ViroSeq HIV-1 genotyping system v2.0 on HIV-1 strains circulating in Senegal

Moussa Thiam^a, Halimatou Diop-Ndiaye^a, Khady Kebe^a, Nicole Vidal^c, Rokhaya Diakhate-Lô^a, Abou Abdallah Malick Diouara^a, Nafissatou Leye^a, Ousseynou Ndiaye^a, Amina Sow^a, Ndely Fatou Ngom-Gueye^b, Souleymane Mboup^a, Coumba Toure-Kane^{a,*}

^a Laboratory of Bacteriology and Virology, Le Dantec Hospital, Dakar, Senegal

^b Ambulatory Care Unit, Fann Hospital Dakar, Senegal

^c UMI 233, IRD Montpellier, France

ABSTRACT

Article history:

Received 14 April 2012

Received in revised form

22 November 2012

Accepted 28 November 2012

Available online xxx

Keywords:

ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0

Performance

Sequencing primers

Senegal

The objective of this study was to investigate the performance of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 on HIV-1 non-B strains identified in Senegalese patients. The study involved 150 patients, and genotyping was performed using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 or an in-house method developed by the French National Agency on AIDS Research AC11 when the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 failed. The sequences were edited to assess the performance of sequencing primers at their presumed binding regions. The Polymorphism was studied in the regions between the sequences of Senegalese patients and the subtype B strains used as references. The phylogenetic analysis showed a predominance of CRF02_AG (88/150; 58.7%) and the circulation of 11 subtypes/CRFs, 16 unique recombinant forms (URFs) and one unclassified sample. The amplification and sequencing rates were 98% (147/150) and 96.6% (142/147), respectively. This study showed that only primer B exhibited 100% success, while the failure rate ranged from 1.4% to 71.4% for the other primers (D: 71.4%, A and H: 12.2%, F: 7.5%, G: 5.5% and C: 1.4%). These findings suggest the need for an alternative method or alternative primers for non-B strains that were not sequenced successfully using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phylogenetic analyses of many human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains isolated from diverse geographic origins have revealed four distinct groups of viruses, i.e., groups M, N, O and, recently, P. Group M, which is responsible for the global pandemic, can be further subdivided into subtypes (i.e., A–D, F–H, J and K), subsubtypes and numerous circulating recombinant forms (CRFs-01 to -52) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). In addition, recombination is ongoing in many areas of the world where different HIV-1 viruses circulate, continuously giving rise to unique recombinant forms (URFs). The global distribution of HIV-1 subtypes/CRFs is not uniform: subtype C is responsible for half of HIV-1 infections and is largely spread in austral Africa, Asia and, more recently, South America; subtype B is the main genetic form in Europe, North America and Australia. The importance of

CRFs in the global pandemic is increasingly recognised, representing the major local forms in Southeast Asia and China (CRF01_AE) and in West and West-Central Africa (CRF02_AG), or spreading in high-risk groups (CRF07_BC or CRF33_01B) in Asia (Tee et al., 2006). In Senegal, circulating HIV-1 strains are characterised by high diversity, and CRF02_AG is the predominant strain in the general population (Toure-Kane et al., 2000; Diop-Ndiaye et al., 2010) and in female sex workers (Hamel et al., 2007). However, a high prevalence of subtype C has been noted among men who have sex with men in Senegal (Diop-Ndiaye et al., 2009). In the developing world, where non-B subtypes are predominant, antiretroviral treatment (ART) has become increasingly available, resulting in the improved health and survival of patients infected with HIV-1. This clinical benefit could be compromised due to the emergence of drug-resistant viruses (Tournoud et al., 2010). Drug testing and the characterisation of mutations that confer resistance to drugs have been developed using subtype B isolates primarily for commercial tests such as Trugene (Siemens) and ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 (Celera, Alameda, CA, USA). The use of these assays on non-B subtype drug resistance testing requires continuous evaluation and comparison to in-house methods that could be more specific for non-B variants (Chen et al., 2007).

* Corresponding author at: Université Cheikh Anta Diop, Dakar, and Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal.

Tel.: +221 33 821 64 20; fax: +221 33 821 64 42.

E-mail address: ctourekan@yahoo.co.uk (C. Toure-Kane).

In Senegal, where ART has been available since 1998, genotyping using sequencing methods was developed from 2003 until 2005 in the laboratory of Bacteriology and Virology (LBV) in Dakar using in-house methods. Since 2005, the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0, a commercial method, has been used for drug resistance testing. NIH/WHO accredited the laboratory as a National Reference Laboratory in 2009 for monitoring drug resistance in HIV-infected patients using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 from Applied Biosystems. However, several cases of misamplification or sequencing failures have been noted, inducing repeated tests or the use of an alternative assay to generate the required sequence lengths for performing the analysis. Previous studies have demonstrated the success of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 for analysing HIV-1 B subtypes in plasma (Cunningham et al., 2001) and non-B subtypes, such as A, C, D and A/D recombinant HIV-1 in clinical plasma samples (Mracna et al., 2001). Recently, a study suggested that the performance of the HIV-1 ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 method may be influenced by polymorphism between B and non-B subtypes (Aghokeng et al., 2011). To better understand the causes of ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 failures that we have noted, we conducted this study to assess the performance of primers on Senegalese strains.

2. Materials and methods

2.1. Specimen collection, viral load and resistance testing

Blood samples were collected by venipuncture using ethylene diamine tetra acetic (EDTA) tubes from three different clinical sites in Dakar, the capital city. This study included 150 samples from 98 treatment-naïve patients and 52 patients undergoing treatment with suspected therapeutic failure. This study was approved by the Senegalese Ethics Committee. The samples were selected based on a viral load greater than 3 Log_{10} copies/ml determined using a m2000rt Abbott RealTime HIV-1 quantitative assay (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Resistance testing was performed on plasma samples using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System version v2.0, according to the manufacturer's instructions (Celera, Alameda, CA, USA). Briefly, after extraction, RNA was amplified via reverse transcription, followed by a one-step PCR to generate a fragment of 1800 base pairs. PCR products were then purified and used for direct sequencing on ABI 3100-Avant using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) to cover the entire protease gene and reverse transcriptase (RT) from amino acids 1 to 320. For sequencing, the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 used seven primers, A, B, C, D (forward primers) and F, G, H (reverse primers). Primer D is intended to replace primer A in case the latter fails. Sequences were analysed using the ViroSeq HIV-1 genotyping system software v2.8 (Celera, Alameda, CA, USA), which generated a drug resistance report. In case of sequencing failure or misamplification, after repeating the assay twice, an in-house method developed by the French National Agency on AIDS Research AC11 resistance study group (<http://www.hivfrenchresistance.org/>) was used. For this assay, after extraction from plasma using the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen, Valencia, Spain), the PCR products were purified and directly sequenced on an ABI3100-Avant using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The generated sequences from two overlapping small fragments were edited using the SeqMan II program from the DNAStar package v.5.08 (LaserGene, Madison, WI, USA). To detect resistance mutations, the entire protease gene and at least the first 240 amino acids of the RT gene were then analysed using the Stanford HIV drug resistance database (<http://hivdb.stanford.edu/>).

2.2. Phylogenetic analysis

HIV-1 subtypes and CRFs designation were determined through phylogenetic analysis. The newly generated nucleotide sequences were aligned, and a neighbour-joining tree was drawn with 100 bootstrap replicates, implemented in ClustalX 1.83. All pure subtypes and CRFs available in the Los Alamos database were included in the analysis in a first intention. To determine whether the viruses were recombinant, a similarity analysis followed by bootstrapping was performed using the Simplot version 3.5.1 software. When a recombinant pattern was found or suspected, individual phylogenetic trees were processed for each segment constituting the mosaic strain, and these trees were used to confirm the Simplot analyses. To identify any polymorphic differences in the suspected primer binding area that could influence their performance, generated sequences were analysed online using the SeqPublish and Sequence Locator from Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). HXB2 (accession no. K03455) and some B subtypes from GenBank were added as references and aligned. Those regions identified within *gag-pol* that are speculated to contain primer binding sites are based on estimates by Aghokeng et al. (2011).

3. Results

3.1. Patient characteristics

The general characteristics of the 150 infected patients were as follows: 96 women and 54 men (sex ratio: 0.7), aged from 20 to 73 (median: 39 years). The median viral load for the 98 untreated patients was 5.12 Log_{10} copies/ml [3.01–6.55] and 4.75 Log_{10} copies/ml [3.12–6.13] for the 52 infected patients under antiviral drugs.

Among the 98 naïve patients, no major mutation conferring resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTIs) or protease inhibitor (PIs) was detected. However, one case of mutation at position V108I, conferring resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), was found (1.0%).

Of the 52 patients under antiviral drugs, the first-line therapeutic regimens were NRTIs + EFV/NVP (37/52; 71.15%) and NRTIs + PI/r (15/52; 28.85%) for the second-line. Among them, 41/52 (78.8%) had at least one major mutation associated with drug resistance. Seven samples had mutations conferring resistance to one ART class only, with 1/41 (2.4%) to NRTIs and 6/41 (14.6%) to the first generation of NNRTIs. Twenty-eight patients had mutations conferring resistance to two classes, with 28/41 (68.3%) to NRTI + NNRTI and 3/41 (7.3%) to NRTI + PI. Finally, 3/41 (7.3%) harboured resistance mutations to the three classes.

3.2. Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis showed that CRF02_AG was predominant (88/150; 58.7%), and the overall subtype distribution was as follows: C (16/150; 10.7%), A3 (10/150; 6.7%), B and CRF06_cpx each (4/150; 2.7%), G (3/150; 2.0%), CRF09_cpx and D each (2/150; 1.3%), CRF01_AE, CRF49_cpx, K and CRF45_cpx each (1/150; 0.7%). Sixteen unique recombinant forms (URFs) were also found, represented by CRF02_AG/A3 (3/150; 2%), CRF02_AG/A (2/150; 1.3%), and (1/150; 0.7%) for the following: CRF02_AG/CRF06_cpx, CRF02_AG/CRF06_cpx/U, CRF02_AG/U, CRF02_AG/U/CRF02_AG, CRF09_cpx/CRF02_AG, CRF36_cpx/CRF02_AG, CRF43_02G/G, G/CRF02_AG/A, G/CRF06_cpx/CRF02_AG/CRF06_cpx, U/A/U/A, and U/CRF45_cpx. Subtypes/CRFs were assigned according to the precise clustering of the strain in individual phylogenetic trees for each segment defining a mosaic strain. For example, URFs CRF02_AG/A3 differed from URFs CRF02_AG/A in that the

Table 1

Performance of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 primers for each subtype, CRF and URF.

HIV-1 subtypes/CRF/URF	N	% of failure rate of each primer																				
		A			B			C			D			F			G			H		
		F	S	%	F	S	%	F	S	%	F	S	%	F	S	%	F	S	%	F	S	%
A3	9	1	8	11.11	0	9	0	0	9	0	7	2	77.78	3	6	33.33	0	9	0	1	8	11.11
B	4	0	4	0	0	4	0	0	4	0	1	3	25	0	4	0	0	4	0	0	4	0
C	16	3	13	18.75	0	16	0	0	16	0	15	1	93.75	0	16	0	1	15	6.25	0	16	0
CRF01_AE	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0
CRF02_AG	86	6	80	6.98	0	86	0	1	85	1.16	62	24	72.09	6	80	6.98	4	82	4.65	12	74	13.95
CRF02_AG/A	2	1	1	50	0	2	0	1	1	50	2	0	100	0	2	0	0	2	0	1	1	50
CRF02_AG/A3	3	1	2	33.33	0	3	0	0	3	0	3	0	100	1	2	33.33	0	3	0	0	3	0
CRF02_AG/CRF06_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF02_AG/CRF06_cpx/U	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF02_AG/U	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF02_AG/U/CRF02_AG	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF06_cpx	4	2	2	50	0	4	0	0	4	0	3	1	75	0	4	0	1	3	25	0	4	0
CRF09_cpx	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0	100	0	2	0	0	2	0	0	2	0
CRF09_cpx/CRF02_AG	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF36_cpx/CRF02_AG	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF43_02G/G	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF45_cpx	1	1	0	100	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
CRF49_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100
D	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
G	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	1	2	33.33	0	3	0	0	3	0	1	2	33.3
G/CRF02_AG/A	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
G/CRF06_cpx/CRF02_AG/CRF06_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
K	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
U/A/U/A	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
U/CRF45_cpx	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Unclassified	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	100	1	0	100	0	1	0	0	1	0
Total	147	18	129	12.24	0	147	0	2	145	1.36	105	42	71.43	11	136	7.48	8	139	5.44	18	129	12.24

Primers: A, B, C, D, F, G, H. S – Successful, F – Failure, N – Number of strains tested, % – percentage of failure rate.

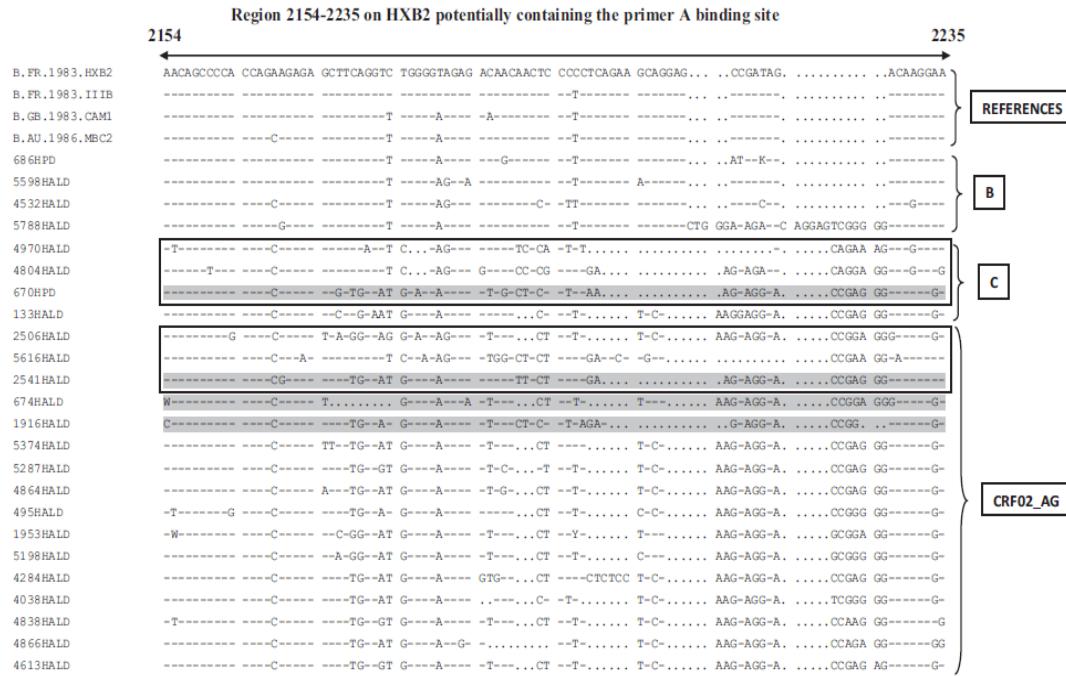


Fig. 1. Comparative alignment with 24 non-B and B strains in the suspected binding region of primer A. The fragment was from HXB2 nucleotide regions 2154–2235. Subtypes are indicated on the right of the alignment, and the sequences that failed with primer A are boxed. Samples not amplified or sequenced with the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 were highlighted. ... Gap between our sequences and the reference subtype B sequence HXB2. – Similarity between our sequences and the reference subtype B sequence HXB2. Letter: difference between our sequences and the reference subtype B sequence HXB2.

second segment was clearly branched within the A3 subsubtype references, whereas in CRF02_AG/A URFs, the second segment was inside the large subtype A cluster without precise localisation inside either the A1 or A3 subsubtype strains. Finally, the results showed one case of an unclassified sequence that did not cluster with known subtypes/CRFs even with bootstrapping and for which blast searches were uninformative. In addition, all sequences were distributed without forming any particular cluster within the phylogenetic tree.

3.3. Primer performance and genetic diversity

Primers were considered positive when the sequencing was successful and negative when sequencing failed or gave heterogeneous signals on the chromatograms, either for the full fragment or in a subregion of the read. At the global level, ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 primer amplification and sequencing success were 98% (147/150) and 96.6% (142/147), respectively. The 8 samples that failed using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 were subsequently analysed using nested PCR, according to the French National Agency on AIDS Research AC11 in-house method. Phylogenetic analysis revealed that the 8 strains included CRF02_AG ($n=4$), A3 ($n=2$), CRF49.cpx ($n=1$) and one URF (CRF02_AG/A3).

All information on the primer performance is presented in Table 1.

The failure rate according to the sequencing primers were as follows: D (105/147, 71.4%), A and H (18/147, 12.2%), F (11/147, 7.5%), G (8/147, 5.4%) and C (2/147, 1.4%). Failure for primer B was not detected. The performance of primer C was the second-best, with a 1.2% failure for only the CRF02_AG samples (1/86) and no failure for the other strains of the panel, except one CRF02_AG/A unique recombinant. The third-best primer (G) showed approximately

a 6% failure for subtype C strains (1/16) and a 5% failure for CRF02_AG strains (4/86), but primer G sequenced all other variants, except 3 samples (1 CRF01_AE, 1 CRF06.cpx, 1 URF). Primer F had a nearly 7% failure for sequencing CRF02_AG strains (6/86), a one-third failure for both sub-subtype A3 (3/9) and the CRF02_AG/A3 unique recombinants (1/3), but no failure for the other HIV-1 variants, except the undetermined sample. Primers A and H had the second-highest failure rates, although the profiles differed based on subtype/CRF. Primer A exhibited a 31% failure for the URFs (5/16), 19% for subtype C strains (3/16), 11% for A3 sub-subtype (1/9), 7% for CRF02_AG strains (6/86), and between 0% and a one-time 100% failure for the other variants. Primer H exhibited 19% failure for the URFs (3/16), 14% for the CRF02_AG strains (12/86), and 11% for sub-subtype A3 (1/9), but no failure was noted for the other variants (including subtype C), except one subtype G and the CRF49.cpx sample. The accessory primer D exhibited a 100% failure for 12 of 16 unique recombinants, 94% failure for subtype C strains (15/16), 78% for A3 sub-subtype (7/9), 72% for CRF02_AG strains (62/86), and between 0% and 100% for the other subtypes/CRFs. Primer D had the highest failure rate, but it was included in the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 as a supplementary product in cases when primer A failed. Of the 18 samples that failed using primer A, only five were successfully sequenced using primer D (27.8%; 5/18). Phylogenetic analysis of these five strains revealed that they were CRF02_AG ($n=2$), A3 ($n=1$) and two URFs (CRF02_AG/U/CRF02_AG and CRF02_AG/CRF06.cpx/U). The sequences were inspected to identify any polymorphic differences in the suspected binding regions of primers A and D. We did not find any difference or polymorphism that could explain why samples that failed with primer A were successfully sequenced with primer D.

As over 10% of the studied samples were classified as URFs, the positions of the breakpoints were mapped onto the HIV-1 HXB2

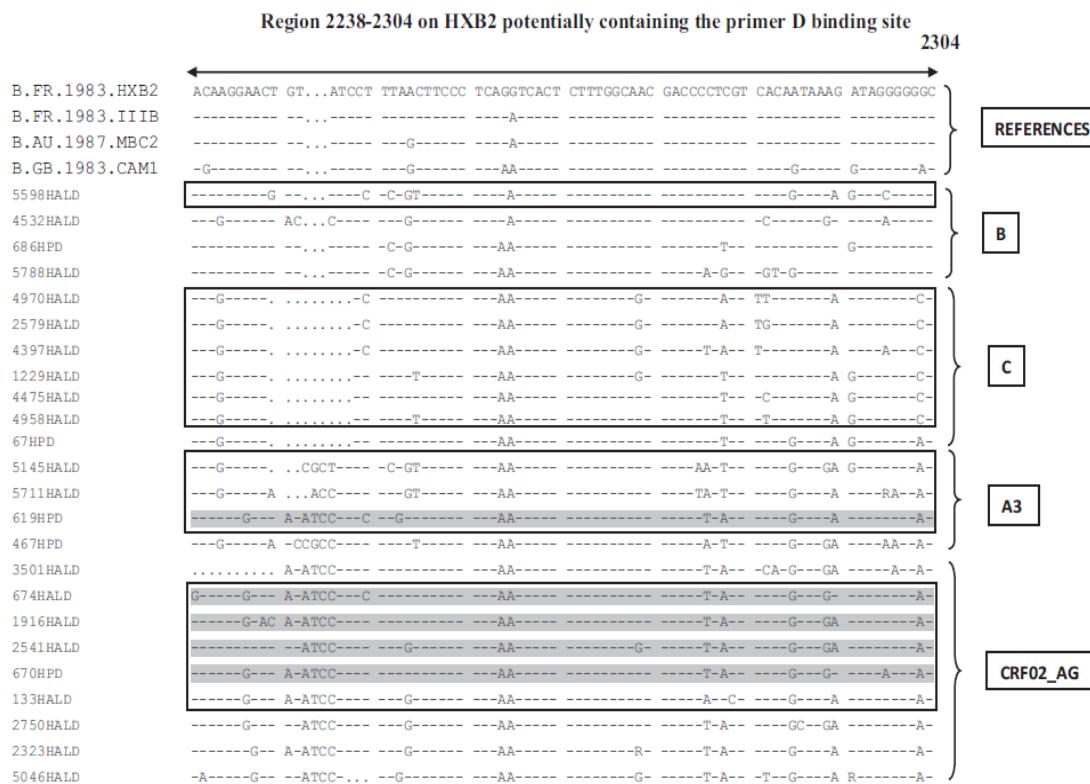


Fig. 2. Comparative alignment with 24 non-B and B strains in the suspected binding region of primer D. The fragment was from HXB2 nucleotide regions 2238–2304. The rest of the legend is similar to that of Fig. 1.

genome relative to the speculated binding positions of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 primers. Most of the breakpoints were located around position 3000 on the HXB2 genome, which may correspond to the binding regions of primers C and G. These primers were, respectively, the second- and third-best primers of the assay. However, each of them failed to sequence a unique recombinant virus. Other breakpoints were located around position 2600 on the HXB2 genome, which may affect the binding of primers F and B. Indeed, primer F failed to sequence one URF CRF02_AG/A3. However, primer B never resulted in failure.

Any effect of treatment and/or resistance mutations on the performance of sequencing primers was studied. Of the eight samples that failed the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0, six were from patients under treatment who harboured resistance mutations to both NNRTI and NRTI. However, among these patients, we did not find any difference or polymorphism that could explain the failure of the sequencing primers compared to the sequences from the other patients.

Globally, except for primer D, we noted high failure rates of 7% and 14% for primers A and H, respectively, with CRF02_AG strains, and a higher failure rate of primer A on subtype C (19%). However, the ideal identification of drug resistance mutations requires successful sequencing of both forward and reverse sequences to confirm mixture peaks (Huang et al., 2003). CRF02_AG and C together represented almost 70% of the HIV-1 strains in the panel. The failure of primer A could result in sub-optimal genotyping of the protease region for significant proportions of Senegalese strains, and the failure of primer H may yield a similar result for the second part of reverse transcriptase. A few subtypes were perfectly

sequenced with all primers: B ($n=3/4$) and D ($n=2/2$), consistent with the development of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 on subtype B strains, and K ($n=1/1$).

Figs. 1–3 show the polymorphism between subtype B strains as references and 24 sequences that largely cover the presumed binding regions for primers A, D and H, which had the highest failure rates. The eight samples that were not amplified or sequenced using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 are highlighted.

4. Discussion

This study found a predominance of CRF02_AG (86/147, 58.5%) and found that there was the circulation of 11 subtypes/CRFs, 16 unique recombinant forms and one unclassified sample, which is representative of a very high genetic diversity. The predominance of CRF02_AG has been previously described, particularly in Senegal and generally in West Africa (Peeters et al., 2010). The prevalence of subtype C strains and unique recombinants was higher than previously described in the general population of Senegal (Toure-Kane et al., 2000). However, subtype/CRF distribution can change over time in some high-risk groups, such as female sex workers (Hamel et al., 2007). The high prevalence of subtype C among men who have sex with men in Senegal and their unsafe links with women might lead to an increase of subtype C strains in the low-risk population (Diop-Ndiaye et al., 2009). Furthermore, a very high level of genetic diversity, with substantial numbers of URFs and an increased prevalence of subtype C strains, was previously described in untreated Senegalese patients from 1998 to 2007 (Diop-Ndiaye et al., 2010).

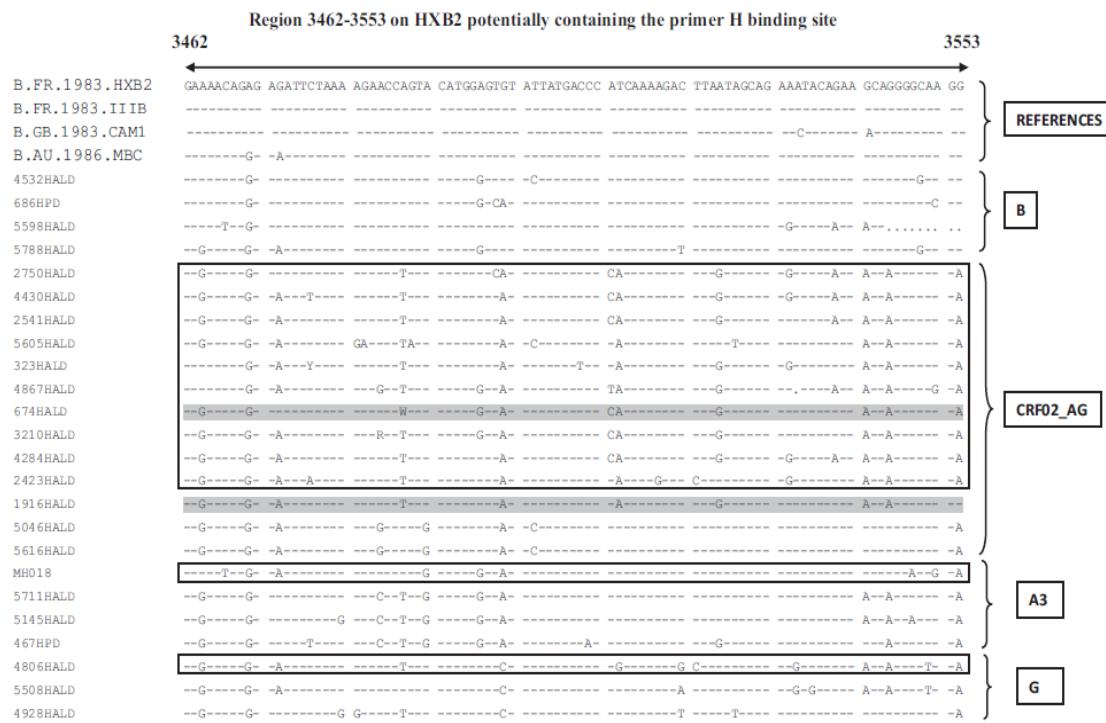


Fig. 3. Comparative alignment with 24 non-B and B strains in the suspected binding region of primer H. The fragment was from HXB2 nucleotide regions 3462–3553. The rest of the legend is similar to that of Fig. 1.

HIV-1 genetic diversity can affect the performance of drug resistance genotyping assays. ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 efficiency is linked to the performance of the sequencing primers. However, the primers have been optimised for subtype B strains in the commercial assay (Eshleman et al., 2005). Here, we evaluated the performance of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 primers on non-B strains circulating in Senegal. The global ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 amplification and sequencing rates were 98% (147/150) and 96.6% (142/147), respectively. The sequencing rate was similar to rates described in Uganda (97%) and Cameroon (99.3%) (Mraclna et al., 2001; Aghokeng et al., 2011) and to the 98% success rate previously observed for a panel of diverse HIV-1 strains (Eshleman et al., 2004). Eight samples failed using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0, and their phylogenetic analyses revealed that they were CRF02_AG ($n=4$), A3 ($n=2$), CRF49_cpx ($n=1$) and one URF (CRF02_AG/A3). No obvious pattern of polymorphisms was observed among these samples. However, because multiple factors can influence primer performance, including template concentration or conservation and the assay conditions, particularly PCR temperatures, it would be presumptive to assume that the observed primer failures for those samples are due solely to HIV-1 genetic diversity (Eshleman et al., 2004). However, of the failed samples, the four CRF02_AG and one A3 subsubtype patients who were currently under treatment and harboured mutations that conferred resistance to both NNRTI and NRTI. However, in previous studies in Cameroon and Belgium, only one sample was not amplified (Aghokeng et al., 2011; Maes et al., 2004). The performance analysis showed that primer D had the highest failure rate (71.4%) and that primer B had the highest success rate (100%). Similar results have been observed in non-B subtypes for primer D (52.6% failure) (Aghokeng et al., 2011) and in B and non-B subtypes for primer B (Maes et al., 2004; Aghokeng et al., 2011). Primer D was added for cases in which primer A failed

and obviously did not completely resolve the issue. In addition to its high failure rate, particularly for CFR02_AG and subtype C strains, primer D could sequence only 5 of 18 samples that failed to be sequenced by primer A (27.8%; 5/18). The performances of the other primers (i.e., A, C, F, G and H) were significantly correlated with results obtained in Cameroon on non-B subtypes (Aghokeng et al., 2011) but were very different from those on B subtype strains, for which the success rate ranged between 90 and 99% (Mraclna et al., 2001; Eshleman et al., 2005). The failure rates of several primers (i.e., A, D, H) were higher on CRF02_AG and the subtype C strains predominant in Senegal. Globally, this will result in inadequate genotyping of the protease and the second part of the reverse transcriptase regions for some Senegalese patients.

To determine what could explain the differences in primers performances with regard to the subtypes/CRFs, we investigated the differences in natural polymorphisms between B and non-B subtypes in the presumed binding regions of primers A, D, and H. Polymorphism was higher in HIV-1 non-B strains than in B strains. However, globally, no particular polymorphism pattern was associated with failure or success, and there were no common polymorphic pattern or mutations between the represented non-B subtypes that could predict the primer performances, as was true in Cameroon (Aghokeng et al., 2011). One limitation of the current study is that the precise primer binding sites are not known. This complicates the interpretation of the natural polymorphism data. It is possible that the inability to identify differences between sequences that are successfully sequenced as opposed to those that are not occurs because the primer binding sites are not encompassed by the regions examined. These findings demonstrate the need to consider non-B subtypes in the evaluation of drug resistance assays used in areas where these strains circulate, such as Africa and particularly West and Central Africa. These results also suggest the need for an alternative method or additional primers

and/or changes in the PCR conditions for non-B strains that are not successfully sequenced using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0.

Sequence accession numbers

The 150 new sequences of the HIV-1 isolates characterised in this study have been deposited in GenBank under the following numbers: JN673567 to JN673713 and JQ855853 to JQ855855.

Acknowledgments

This work was supported by Ministry of Health through the national division against AIDS and STI WHO monitoring and the CHAIN project.

We thank all of the people who directly or indirectly contributed to the successful completion of this study. We declare that we have no competing interests.

References

- Aghokeng, A.F., Mpoudi-Ngole, E., Chia, J.E., Edoul, E.M., Delaporte, E., Peeters, M., 2011. High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1635–1641.
- Chen, J.H., Wong, K.H., Chan, K., Lam, H.Y., Lee, S.S., Li, P., Lee, M.P., Tsang, D.N., Zheng, B.J., Yuen, K.Y., Yam, W.C., 2007. Evaluation of an in-house genotyping resistance test for HIV-1 drug resistance interpretation and genotyping. *J. Clin. Virol.* 39, 125–131.
- Cunningham, S., Ank, B., Lewis, D., Lu, W., Wantman, M., Dileanis, J.A., Jackson, J.B., Palumbo, P., Krogstad, P., Eshleman, S.H., 2001. Performance of the Applied Biosystems ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1254–1257.
- Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, C., Vidal, N., Niama, F.R., Niang-Diallo, P.A., Dieye, T., Gaye-Diallo, A., Wade, A.S., Peeters, M., MBoup, S., 2009. Surprisingly high prevalence of subtype C and specific HIV-1 subtype/CRF distribution in men having sex with men in Senegal. *J. Acquir. Immune Def. 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.
- Eshleman, S.H., Hackett, J.J., Swanson, P., Cunningham, S.P., Drews, B., Brennan, C., Devare, S.G., Zekeng, L., Kapitú, L., Marlowe, N., 2004. Performance of the Celera Diagnostics Viroseq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2711–2717.
- Eshleman, S.H., Crutcher, G., Petruskene, O., Kunstman, K., Cunningham, S.P., Trevino, C., Davis, C., Kennedy, J., Fairman, J., Foley, B., Kop, J., 2005. Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer. *J. Clin. Microbiol.* 43, 813–817.
- Hamel, D.J., Sankalé, J.L., Eisen, G., Meloni, S.T., Mullins, C., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Kanki, P.J., 2007. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV-1 diversity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 1189–1196.
- Huang, D.D., Eshleman, S.H., Brambilla, D.J., Palumbo, P.E., Bremer, J.W., 2003. Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3265–3272.
- Maes, B., Schrooten, Y., Snoeck, J., Derdelinckx, I., Van Ranst, M., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., 2004. Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J. Virol. Methods* 119, 45–49.
- Mracna, M., Becker-Pergola, G., Dileanis, J., Guay, L.A., Cunningham, S., Jackson, J.B., Eshleman, S.H., 2001. Performance of Applied Biosystems ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of non-subtype B human immunodeficiency virus type 1 from Uganda. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4323–4327.
- 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.
- Tee, K.K., Li, X.J., Nothomi, K., Ng, K.P., Kamarulzaman, A., Takebe, Y., 2006. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* 43, 523–529.
- 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.
- Tournoud, M., Etard, J.F., Ecochard, R., DeGruttola, V., 2010. Adherence to antiretroviral therapy virological response, and time to resistance in the Dakar cohort. *Stat. Med.* 29, 14–32.

Communication :

Thiam M, Vidal N, Diouf A, Diop-Ndiaye H, Diallo MB, De Beaudrap P, Taverne B, Ndoye I, Sow PS, Peeters M, Delaporte E, Mboup S, Toure-Kane C, for the ANRS 1215 study group: **Documentation d'un cas de surinfection chez une patiente VIH-1 groupe M sous ARV au Sénégal.**
In: *INTEREST*. Poster number P_28. Dakar, Sénégal; 2013.

II.4. Documentation d'un cas de surinfection chez une patiente VIH-1 groupe M sous ARV au Sénégal (cohorte ANRS 1215)

II.4.1. Introduction : découverte de la surinfection

La cohorte du projet ANRS 1215 était constituée des 444 premiers patients inclus dans l'initiative sénégalaise d'accès aux antirétroviraux (ISAARV) depuis 1998. Les patients bénéficiaient d'un suivi clinique et virologique tous les six mois, à savoir : la quantification de la charge virale, l'étude des mutations de résistance pour tout patient ayant une charge virale supérieure à 1000 copies/ml et une étude de phylogénie afin de documenter les différents variants VIH-1 qui circulent au Sénégal.

Durant ce suivi virologique, un cas unique a montré un résultat particulier. Il s'agit d'une patiente que nous appellerons X qui, entre 2001 et 2006, sur quatre prélèvements consécutifs, était porteuse d'un virus de sous-type G par génotypage du gène *pol*. Cependant, un nouveau prélèvement, réalisé en 2009, a révélé un virus différent, constitué pour une partie de l'ancien virus de sous-type G, et pour l'autre partie, d'un nouveau virus CRF18_cpx (voir figure 36). La seule explication possible consiste en un évènement de surinfection de cette patiente : initialement infectée par un virus de sous-type G, et malgré la mise sous traitement, elle aurait acquis un second virus CRF18_cpx, puis les deux virus auraient recombiné dans le gène *pol* pour donner naissance au recombinant unique observé dans le dernier prélèvement.

La documentation de la surinfection est donc partie du constat de la recombinaison (figure 36). Documenter cette surinfection devient important car ces cas sont peu fréquents ou rarement détectés.

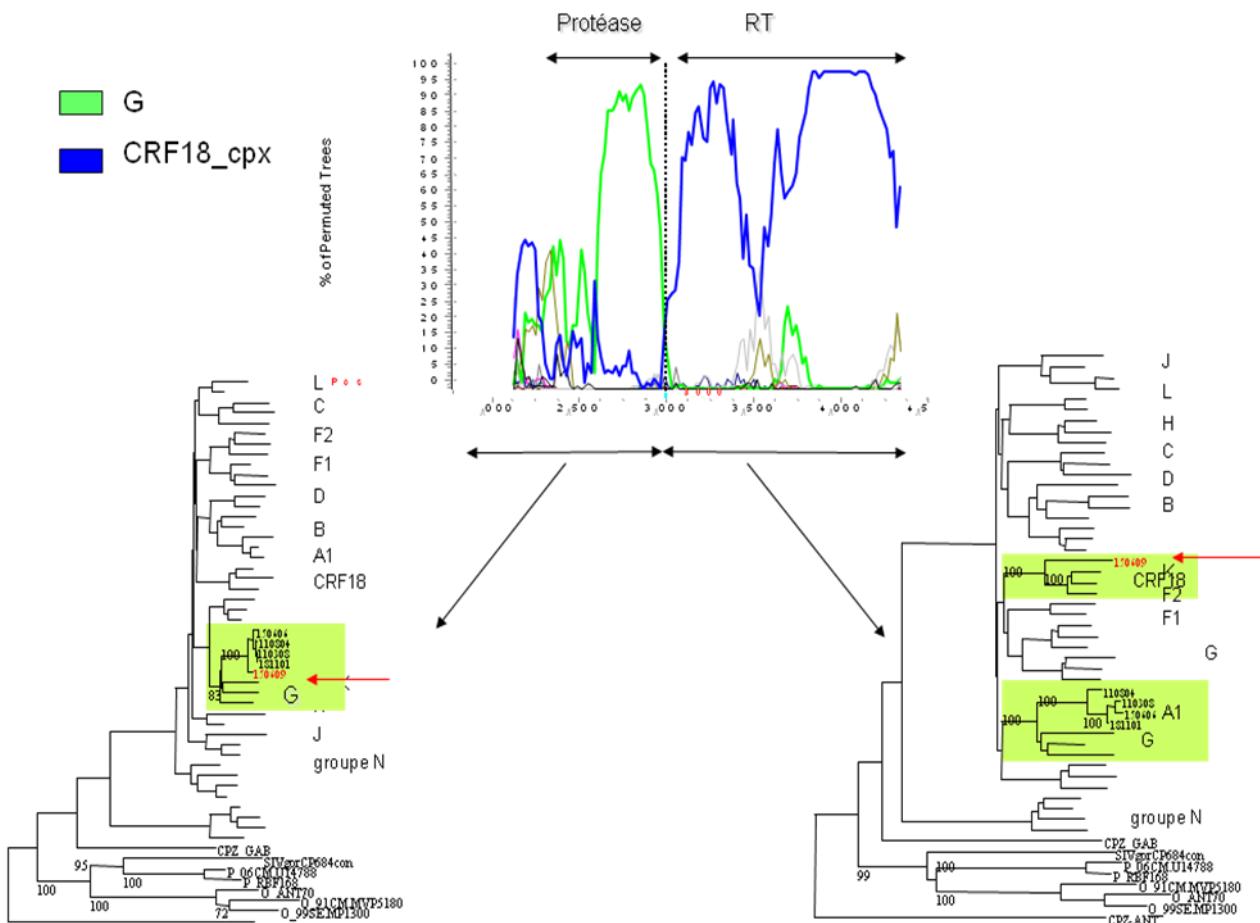


Figure 36 : Phylogénie et analyse de recombinaison des prélèvements

Cette figure montre le profil de recombinaison de la souche de la patiente X, qui est de sous-type G dans la protéase et CRF18_cpx au niveau de la transcriptase inverse. Pour le confirmer, des arbres phylogénétiques ont été effectués séparément sur les différentes parties qui constituent cette séquence. Cela confirme le résultat du Bootscanning avec du G sur la protéase (arbre à gauche) et du CRF18_cpx sur la transcriptase inverse (arbre à droite). Elle montre également que le sous-type G est bien le virus initial porté par la patiente X.

II.4.2. Méthodologie

• Echantillonnage

Le tableau ci-dessous donne les différents points du suivi biologique et thérapeutique de la patiente X depuis la mise sous ARV jusqu'au dernier point de suivi disponible.

Tableau XIII : Liste des prélèvements séquentiels de la patiente X

Temps	CV	CD4	Traitement	NRTI	NNRTI	Phylogénie
J0	281503	178	d4T ddI EFZ			
M006	28043	562	d4T ddI EFZ			
M012	75001	159	d4T ddI EFZ	-	K103N, Y188L	G
M018			d4T ddI EFZ			
M024			d4T ddI EFZ			
M030	240000	157	d4T ddI EFZ			
M036	2080	96	d4T ddI EFZ			
M042	33200	132	d4T ddI NVP	-	-	G
M048		116	3TC AZT NFV			
M054	100001	160	3TC AZT NFV			
M060	12900		3TC AZT NFV			
M066	16500	254	3TC AZT NFV	M184V	K103N, Y188L	G
M074	100001	149	3TC AZT NFV			
M078	2520	302	ddI TDF LPV/r			
M084	49		ddI TDF LPV/r			
M090	25000	163	ddI TDF LPV/r	-	K103N, Y188L	G
M096	39700	164	ddI TDF LPV/r			
M102	84900	168	ddI TDF LPV/r	-	-	URF (G/CRF18_cpx)
M112	61	201	ddI ABC LPV/r			

■ Génotypage effectué dans le cadre du projet ANRS 1215

- **Méthode d'étude et d'analyse : single genome amplification (SGA)**

La finalité de la SGA est d'isoler les molécules virales afin que toute PCR positive soit le résultat de l'amplification d'une seule copie de virus.

Afin d'éviter toute contamination, chaque prélèvement est traité seul du début à la fin, soit de l'extraction de l'ARN au séquençage.

Après extraction, l'ARN est soumis à une transcription inverse pour obtenir de l'ADN complémentaire. L'ADN complémentaire obtenu va subir des étapes de dilution en cascade et des réactions de PCR nichées (16 PCR) pour chaque série de dilutions. Nous sélectionnerons la dilution qui donnera au maximum 30% de PCR positives, car la probabilité d'amplifier une seule molécule ou souche virale (isolat) dans les produits de PCR suit la loi de poisson

(Palmer et coll., 2005). Cette dilution sera alors utilisée pour des PCR nichées sur plaque de 96 puits. Un séquençage sera effectué sur les produits de PCR comme étant le résultat d'une amplification à partir d'une seule souche virale.

Les chromatogrammes seront vérifiés pour l'absence de doubles pics qui signifierait la présence de plus d'une molécule initiale (voir figure 37 cidessous).

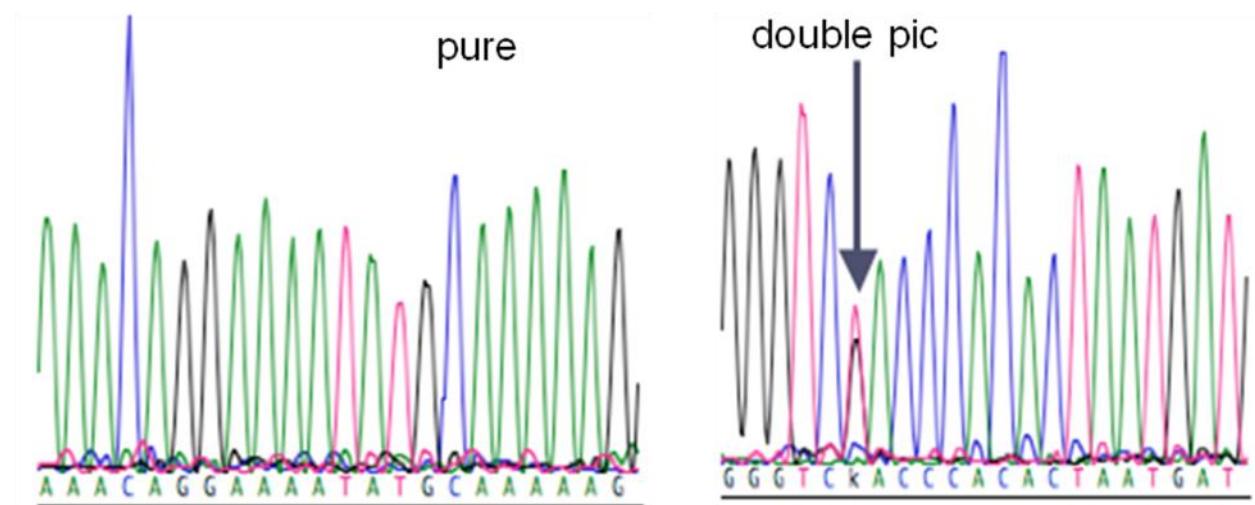


Figure 37 : Présentation des chromatogrammes dans le cas d'une population pure ou mixte

Les séquences obtenues seront alignées et analysées en phylogénie pour déterminer leur nature pure ou recombinante. Elles seront aussi soumises à la base de données de Stanford pour vérifier la présence de mutations associées à une résistances aux ARV.

II.4.3. Résultats

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la SGA en termes de souches (isolats) obtenues sur quatre prélèvements séquentiels et le typage pour l'ensemble des souches obtenues.

Tableau XIV : Les différents isolats et types de souches après SGA et séquençage

Prélèvements	N, isolats uniques (N=n1+n2)	n1, Sous-type G	n2, Autre virus
28/11/2000	19	19	0
11/03/2008	25	25	0
16/02/2009	27	26	1 (G/CRF18_cpx)
15/06/2009	12	8	4 (G/CRF18_cpx)

Ce tableau montre qu'il n'y avait pas de double infection avant la mise sous ARV en 2000 et de 2000 à 2008, car les souches obtenues sont toutes de sous-type G. En plus de ce sous-type G, nous obtenons aussi quelques souches de virus recombinant (G/CRF18_cpx), qui ont été isolées dans les deux derniers prélèvements de 2009.

L'analyse phylogénétique des différents isolats obtenus sur les quatre prélèvements cités ci-dessus, a donné l'arbre qui est représenté sur la figure 38 ci-dessous.

Les différents prélèvements

- █ 28/11/2000
- █ 11/03/2008
- █ 16/02/2009
- █ 15/06/2009

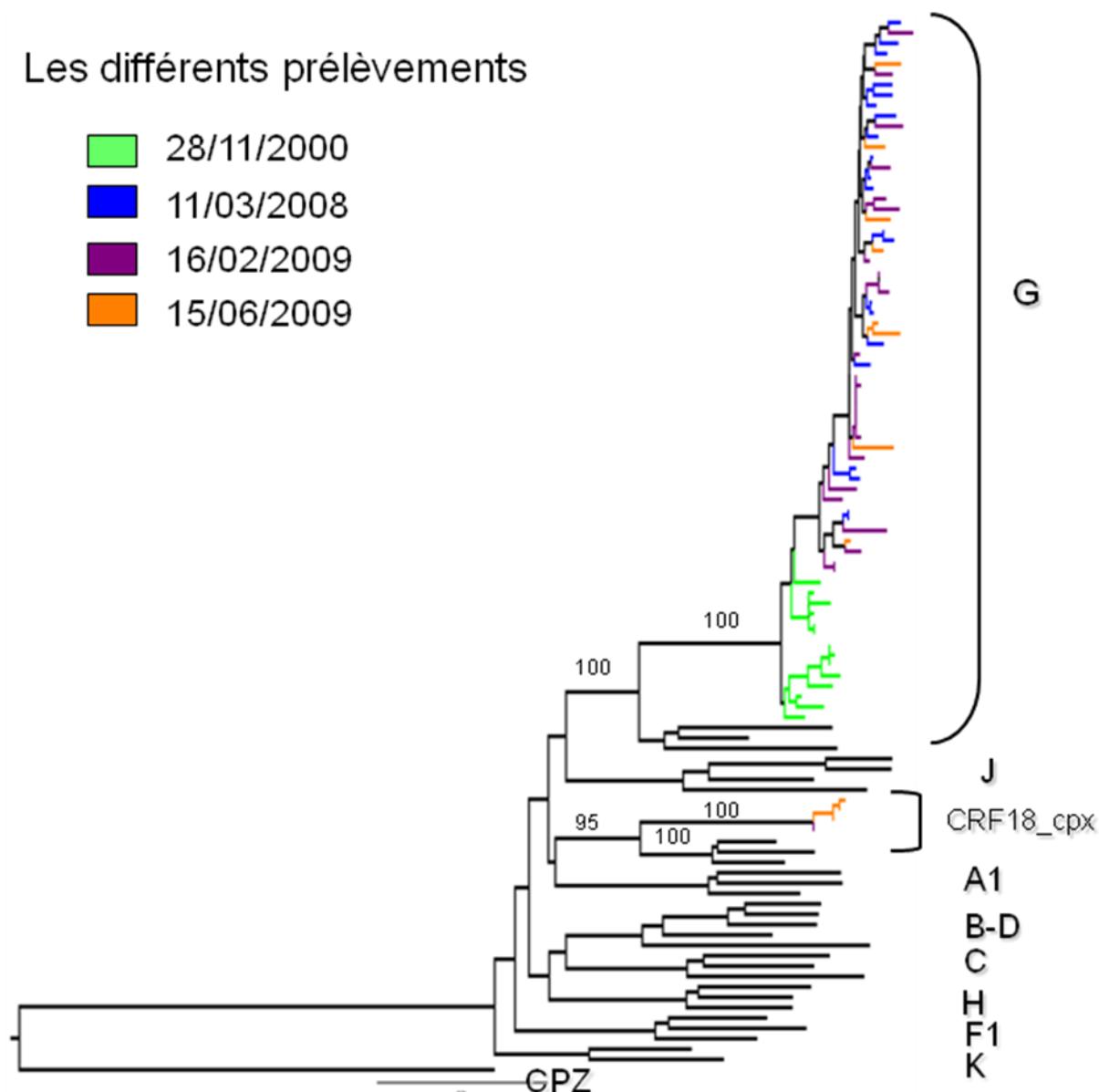


Figure 38 : Phylogénie moléculaire des différents isolats obtenus par SGA

La figure montre que les différentes souches de sous-type G sont toutes regroupées en un même ensemble (cluster en anglais) de souches extrêmement proches. Celles de 2000, provenant du premier prélèvement de la patiente avant la mise sous ARV, se trouvent à la base de cet ensemble. Elles sont dissociées en deux sous-ensembles de séquences, et c'est l'un de ces sous-ensembles qui a évolué au cours du temps dans l'organisme, et à partir duquel se branchent les séquences obtenues ultérieurement. Ces dernières, échantillonées entre début 2008 et mi 2009, se regroupent de manière légèrement séparée des souches initiales, car huit années se sont écoulées. Cependant elles restent mélangées entre elles car sur une période de deux années, cette méthode d'analyse ne permet pas de les différencier. À côté de ces souches de sous-type G, la SGA a permis d'isoler de rares souches mosaïques (G/CRF18_cpx),

branchées de manière parallèle aux souches CRF18_cpx de référence, et qui sont extrêmement proches entre elles.

Une analyse des mutations de résistance utilisant la base de données de Stanford, a aussi été effectuée pour les différents isolats obtenus. Celle-ci, associée aux données de l'observance, ont donné le tableau XV ci-dessous.

Tableau XV : Génotypage de résistance des différents isolats obtenus après SGA

Prélèvements	28/11/2000	06/09/2007	11/03/2008	16/02/2009	15/06/2009
Sous-type	19 G	Non déterminée	25 G	26G+URF	8G+4 URF
Aucune mutation	19 G	Non déterminée	-	1 URF	4 URF
Y188L	-	Non déterminée	-	4 G	6 G
K103N+Y188L	-	Non déterminée	25 G	21 G	2 G
K103N+Y188L+H221Y	-	Non déterminée	-	1 G	-
Observance	100	82,22	100	96,66	93,33

Ce tableau montre qu'il n'y avait pas de mutations de résistance avant la mise de la patiente sous ARV. Cependant, entre 2008 et 2009, des mutations de résistance ont été enregistrées pour les virus de sous-type G, mais pas pour les virus recombinants. Or, le produit de PCR utilisé pour le génotypage en 2009, contenait aussi des virus initiaux de sous-type G, portant des résistances, en plus des virus recombinants non résistants. Ainsi le génotypage tel qu'il est pratiqué ne permet pas de tout détecter en matière de résistances aux antirétroviraux. Nous avons aussi noté une mauvaise observance en 2007, période pendant laquelle, il serait possible que la surinfection ait eu lieu.

Une analyse des données immuno-virologiques de la patiente X durant son suivi thérapeutique est représentée sur la figure 39 ci-dessous.

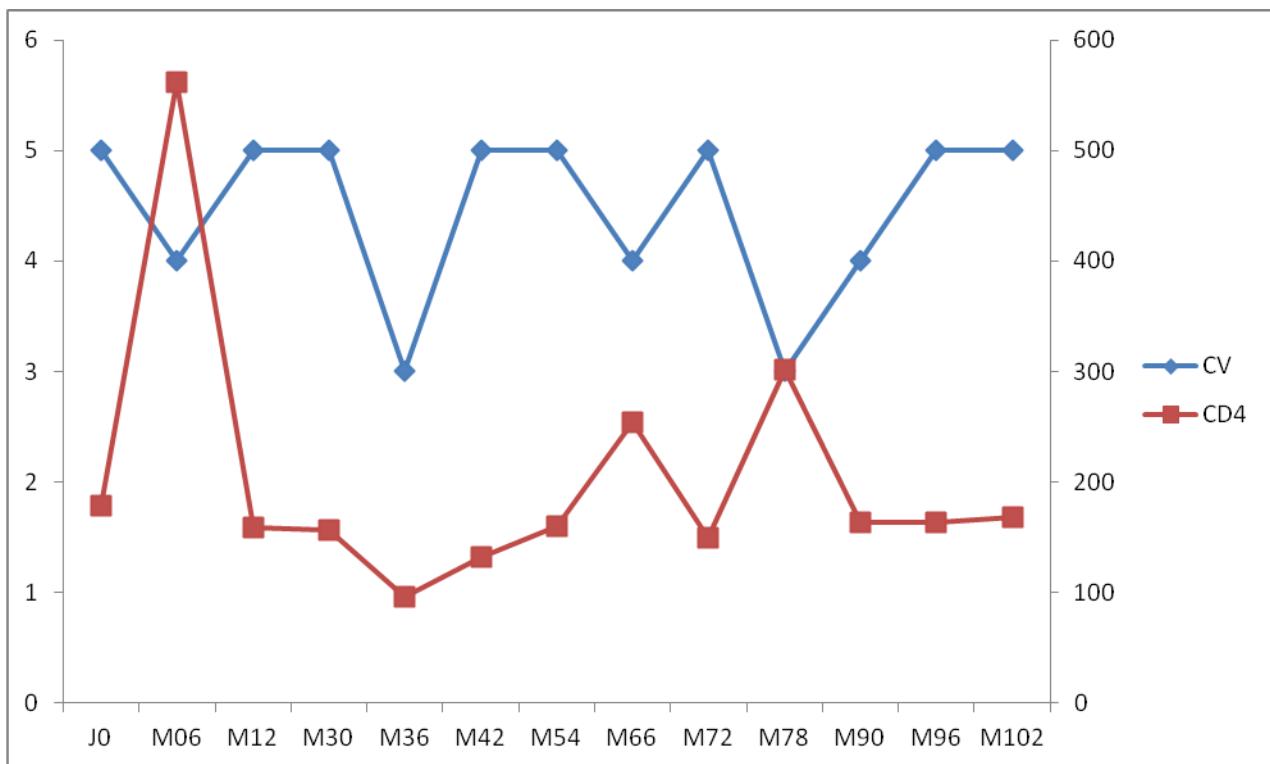


Figure 39 : Evolution des paramètres immuno-virologiques chez la patiente X

Nous constatons sur cette figure, une charge virale exprimée en \log_{10} qui reste supérieure à 3 \log_{10} et le taux de CD4, exprimé en $\text{cellules}/\text{mm}^3$ qui reste inférieur au seuil de 200 $\text{cellules}/\text{mm}^3$ à l'exception des points M06 (6 mois de traitement ARV) et M78.

L'ensemble de ces résultats nous a intrigués et poussés à rechercher la provenance du CRF18_cpx, retrouvé chez la patiente. Nos recherches sur les dossiers cliniques nous ont montré son appartenance à une cohorte de couples séroconcordants. Le conjoint, que nous nommerons Y, a été dépisté depuis 2002 et s'est marié avec la patiente X en 2003. Cette personne avait effectué des voyages en Côte d'Ivoire (1992), ainsi qu'au Cameroun (1993) et au Congo-Brazzaville (entre 1994 et 2002). Or c'est en Afrique Centrale que circulent les virus CRF18_cpx. La figure 40 ci-dessous montre le résultat d'une étude de similarité entre les séquences du couple.

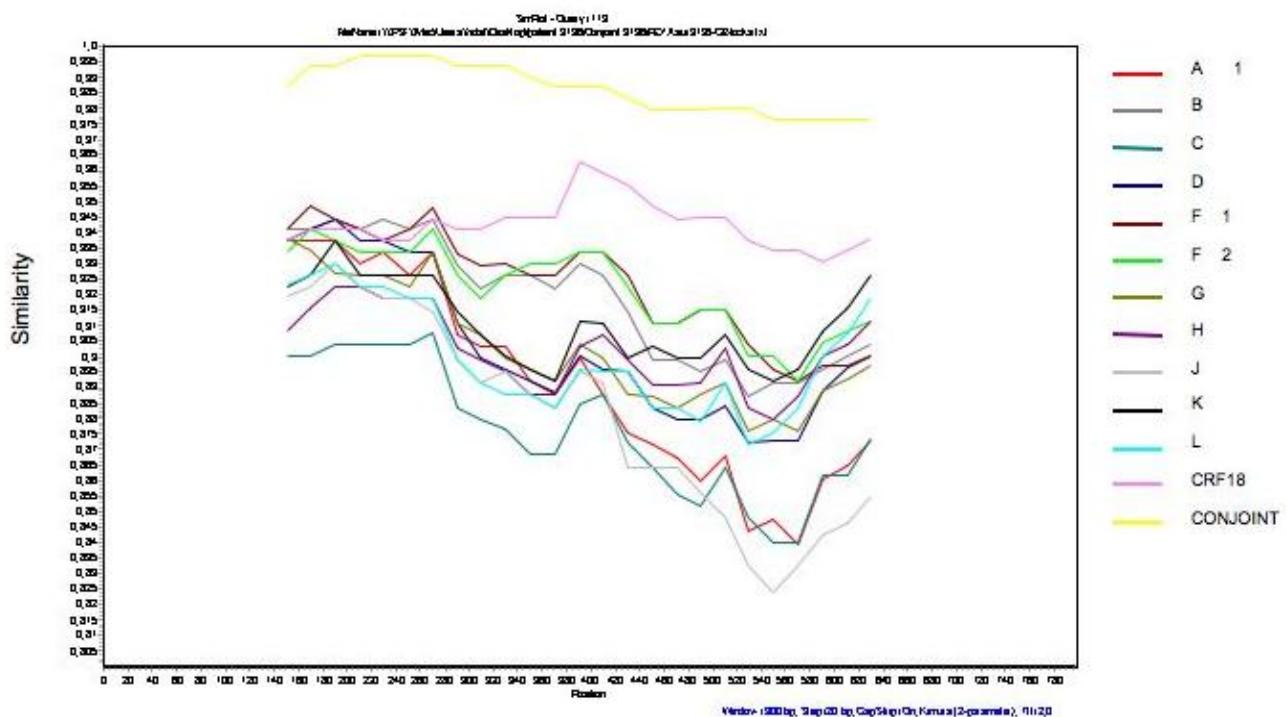


Figure 40 : Résultat de similarité des virus recombinants portés par la patiente X et le conjoint Y

Le génotypage des prélèvements du conjoint Y, a révélé un URF constitué de U/CRF18_cpx qui est extrêmement proche du virus recombinant porté par la patiente X (figure 40).

L'arbre phylogénétique obtenu, en associant les isolats uniques de la patiente X aux séquences obtenues par génotypage du conjoint Y, est représenté dans la figure 41 ci-dessous.

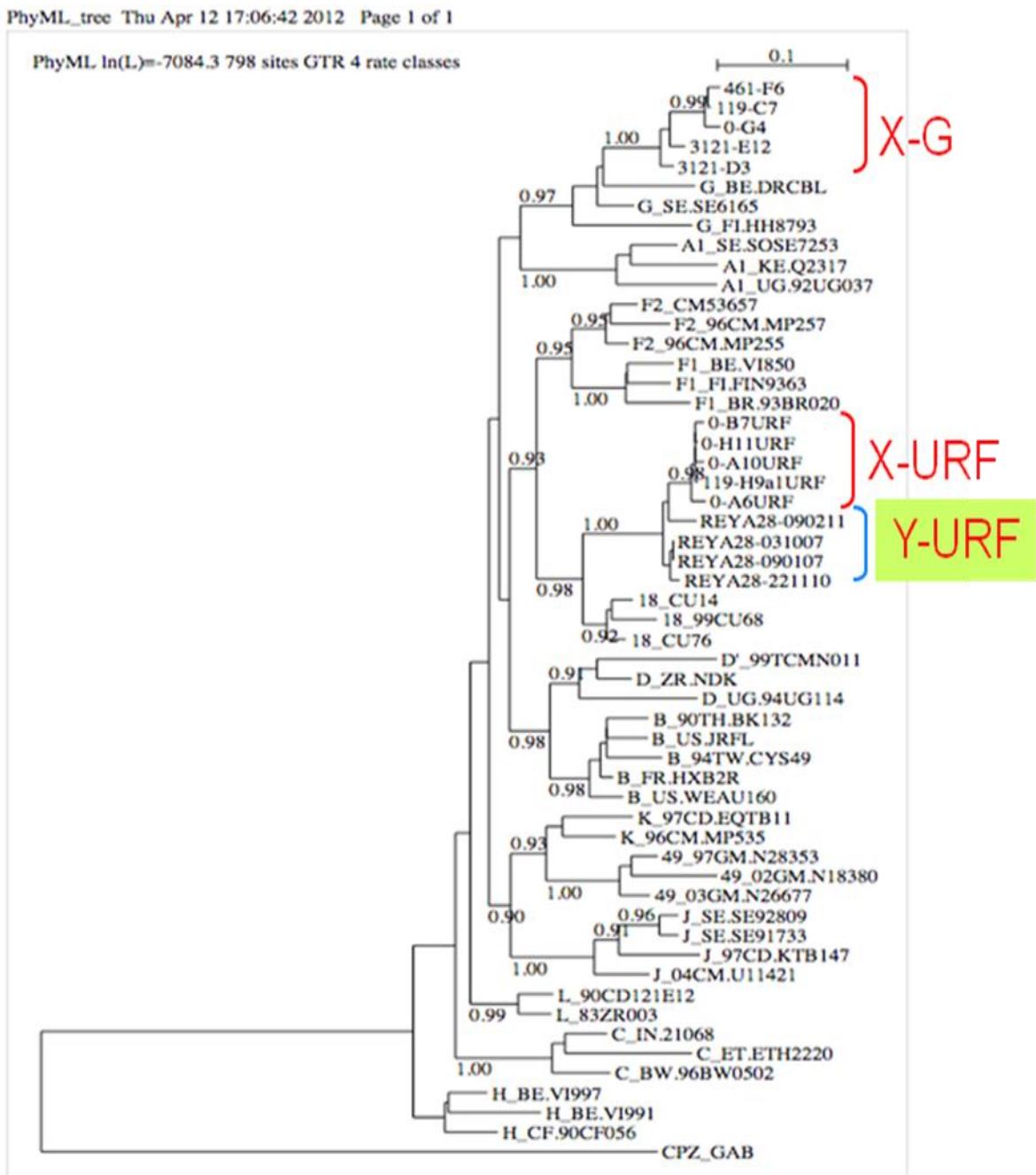


Figure 41 : Lien épidémiologique entre les isolats de la patiente X et ceux de son conjoint Y

Cette figure montre, un lien parfait entre les isolats recombinants contenant du CRF18_cpx de la patiente X avec les séquences du conjoint Y.

II.4.4. Discussion

Les résultats présentés, ont démontré un phénomène de surinfection chez la patiente X dans un contexte de couples séroconcordants. Des évènements de surinfection ont été décrits pour la première fois en 2002 chez les utilisateurs de drogues intraveineuses (**Ramos et coll., 2002**). Il a été démontré que ce phénomène de surinfection était très fréquent dans les populations clés que sont les homosexuels (hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes), les utilisateurs de drogues intraveineuses et les professionnelles du sexe (**Blackard et Mayer, 2004**). Cependant, il est aussi retrouvé dans des couples séroconcordants de la population générale par la pratique de rapports sexuels non protégés comme le montre le cas spécifique que nous présentons ici. La surinfection dans les couples séroconcordants a été aussi décrite par Blick et al en 2007 (**Blick et coll., 2007**). Ces cas de surinfection dans les couples séroconcordants interrogent sur la transmission sexuelle du VIH. Une étude effectuée au Sénégal, a récemment démontré que 74% des couples séroconcordants forment une chaîne de transmission dont le mari est le cas index (**Jennes et coll., 2012**). Nos résultats montrent que la patiente X était à l'origine infectée par le VIH-1 de sous-type G. Par la suite, nous avons trouvé un recombinant G/CRF18_cpx. Cela signifie qu'elle a été surinfectée par un nouveau virus, le CRF18_cpx qui a recombiné avec le sous-type G d'origine, pour donner un URF, G/CRF18_cpx. Il a été démontré que la recombinaison est la conséquence directe des phénomènes de co-infection et de surinfection, favorisant la diversité génétique du VIH-1 dans le monde (**Fang et coll., 2004**). Les figures 40 et 41 semblent montrer que la patiente a acquis le CRF18_cpx de son conjoint Y, qui pourrait être porteur de ce variant depuis 2007 de par des voyages qu'il a effectué en Afrique Centrale (Congo Brazzaville et le Cameroun), zones où circule le CRF18_cpx (**Thomson et coll., 2005**). La période probable où la surinfection aurait eu lieu, est supposée entre 2007 et 2009, période pendant laquelle la patiente avait un défaut d'observance (tableau XV), avec notamment un arrêt volontaire du traitement ARV pendant un mois, en 2007. Il a été documenté, que la surinfection est liée au défaut d'observance chez des patients sous HAART (**Jost et coll., 2002**). Cette période de surinfection coïncide aussi avec un rebond virologique et un déclin du taux de lymphocytes CD4 (**Blackard et Mayer, 2004**). Ce rebond virologique et le déclin du taux de CD4 sont les conséquences d'une forte réPLICATION virale et d'une augmentation de la virulence du virus, ce qui sera à l'origine de la progression rapide vers la phase SIDA (**Jost et coll., 2002**). Ainsi, la figure 39 montre une charge virale toujours supérieure à $3 \log_{10}$ et un taux de CD4 qui reste inférieur au seuil de 200 cellules/mm³ à l'exception des points M06 (6 mois de traitement

ARV) et M78. Cette mauvaise observance explique la présence de mutations majeures de résistance aux INNTIs (Tableau XIII et XV). Ces mutations de résistance étaient absentes avant 2007. Il a été prouvé que ces phénomènes de résistance deviennent plus graves dans le cas de surinfection entre deux virus déjà résistants, car le résultat sera la formation d'un recombinant doublement résistant (**Levy, 2003 ; Blick et coll., 2007**). La surinfection et la recombinaison qui peut en découler sont de potentiels obstacles au développement de vaccins et compromettent l'efficacité des molécules antirétrovirales, surtout dans le cas des virus résistants (**Levy, 2003**).

II.4.5. Conclusion

Cette étude met l'accent sur le risque de nouvelles transmissions dans les couples séroconcordants, dont l'impact peut être important en termes de procréation et de santé publique. Elle montre aussi l'importance d'un suivi régulier, la complexité de la prise en charge des patients infectés par le VIH et la nécessité d'un dispositif d'aide à l'observance.

II.4.6. Communication

Thiam M, Vidal N, Diouf A, Diop-Ndiaye H, Diallo MB, De Beaudrap P, Taverne B, Ndoye I, Sow PS, Peeters M, Delaporte E, Mboup S, Toure-Kane C., for the ANRS 1215 study group: **Documentation d'un cas de surinfection chez une patiente VIH-1 groupe M sous ARV au Sénégal.** In: *INTEREST*. vol. poster number P_28. Dakar, Sénégal; 2013.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les résultats de ces publications scientifiques, qui s'articulent autour des aspects épidémiologiques et techniques de la résistance du VIH-1 aux ARV chez les patients de l'ISAARV, sont très importants, surtout dans un contexte de grande variabilité génétique comme le cas du Sénégal où les ARV circulent depuis 1998 avec une diversité de variants, documentés dès le début des années 2000 (**Touré-Kane et coll., 2000 ; Vergne et coll., 2000**).

Les données issues des 366 premiers patients infectés par le VIH-1 avec un traitement hautement actif (HAART), nous ont permis d'analyser les aspects virologiques chez des patients sous 1^{ière} ligne de traitement ARV pendant 10 ans et la réponse virologique pour ceux en 2^{nde} ligne. Parallèlement à la circulation des ARVs dans les pays à ressources limitées, il est important de renseigner le taux d'échec virologique et l'efficacité des schémas thérapeutiques de 2^{nde} ligne. Cette étude a démontré un succès virologique chez les patients en 1^{ière} ligne chez 80% d'entre eux, et ces résultats sont comparables à ceux observés dans d'autres pays africains et non africains (**Paredes et coll., 2000 ; Ferradini et coll., 2006**). Le risque d'échec virologique est cependant d'une probabilité élevée dans les 24 premiers mois de traitement ARV, avant de se stabiliser. Ce résultat confirme, l'importance d'un suivi plus régulier durant les premiers mois de traitement. Cependant, le taux de patients ayant développé un échec virologique, a été évalué sur la base d'une charge virale supérieure à 1000 copies/ml en utilisant différents tests, ce qui suggère que cette définition pourrait avoir plus d'importance clinique par rapport à celle de l'OMS (CV > 5000 copies/ml) . En se basant sur les données issues des deux premières années de suivi, la proportion de patients ayant développé une mutation de résistance, à au moins une molécule antirétrovirale, est similaire à celle d'autres études avec un suivi dont les intervalles de temps étaient plus rapprochés (**Gupta et coll., 2009**). Pour un temps de suivi plus long (supérieur à 5 ans) (<http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/>), le risque cumulé d'échec virologique et le développement des mutations de résistance est faible ou sensiblement égal à celui des pays développés (**Ledergerber et coll., 1999 ; Mocroft et coll., 2003 ; Richman et coll., 2004 ; Phillips et coll., 2005**). Cependant, le délai parfois important entre l'échec virologique et le changement de ligne thérapeutique, fait que les mutations de résistance deviennent plus fréquentes, comparé à la période de mise sous ARV de 2^{nde} ligne. Les facteurs qui contribuent à ce délai entre le moment de l'échec et le changement de ligne sont diverses. D'abord, les patients concernés sont les premiers de la cohorte ISAARV, alors qu'au début de ce

programme, le nombre de molécules disponibles était limité par rapport au nombre de patients à traiter. En plus, la numération du taux de CD4 et la quantification de la charge virale ne sont effectuées que deux fois dans l'année, alors que ces résultats sont obligatoires, plus particulièrement la charge virale, pour confirmer l'échec virologique avant d'initier un changement de schéma thérapeutique. En 1998, l'indinavir était le seul IP non boosté disponible. Une mauvaise adhérence et un échec virologique précoce entraînant un changement de molécules, sont associés à la prise de cette molécule, caractérisée par une mauvaise tolérance et une posologie complexe (plusieurs comprimés à prendre par jour). De plus la stavudine, qui est utilisée dans presque tous les schémas thérapeutiques de cette cohorte, entraîne beaucoup d'effets secondaires (**Mercier et coll., 2009**). Malgré un taux d'échec virologique élevé, la proportion de personnes ayant développé des mutations de résistance sous trithérapie avec IP est faible. L'absence de corrélation entre l'adhésion au traitement avec IPs et le risque d'échec virologique ou le développement de mutations de résistance (**Harrigan et coll., 2005 ; King et coll., 2005**), met en évidence la robustesse des IPs devant le développement des mutations de résistance par le virus, même chez les patients avec une adhérence faible ou modérée. En plus, les IP boostés actuellement, sont mieux tolérés, comparés aux premiers IPs non boostés, et constituent une meilleure alternative aux INNTIs, chez les patients non adhérents ou lorsque le suivi virologique n'est pas régulier (**Adlington et coll., 2009**). Les résultats obtenus chez les patients en 2^{nde} ligne sont décevants, comparés à ceux des personnes en 1^{ière} ligne. La probabilité d'échec virologique est deux fois plus élevée chez les patients en 2^{nde} ligne que pour ceux en 1^{ière} ligne, comme le montre une étude menée en Afrique de l'Est (**Ajose et coll., 2012**). L'échec virologique durant la mise sous ARV de 2^{nde} ligne apparaît très tôt après le changement de ligne thérapeutique. L'échec virologique chez les patients en 2^{nde} ligne, dû à plusieurs mutations de résistance, montre la nécessité de disposer d'un schéma thérapeutique de troisième ligne dans les pays à ressources limitées. Cette étude est la première dans les pays à ressources limitées, à documenter le taux d'échec virologique et le développement de mutations de résistance pour des patients suivis pendant une longue durée. Les données étant collectées de façon prospective, cette étude échappe davantage aux biais statistiques, comparée aux études transversales (**Pillay et coll., 2005 ; Harrigan et coll., 2005**). Cependant, des facteurs limitants sont à prendre en compte pour l'interprétation des résultats. Parmi ces facteurs, nous avons une population d'étude relativement faible pour une estimation de longue durée et des données absentes comme les tests de génotypage pour 1/3 des patients en échec virologique. L'analyse à imputation

multiple a été utilisée pour tenir compte de ces données manquantes (**Abraham et coll., 2011**).

A coté de cette étude prospective qui a permis une évaluation de la réponse virologique chez des patients de 1^{ière} et 2^{nde} ligne sur la base d'une charge virale supérieure à 1000 copies/ml, nous avons aussi mené une étude transversale sur 72 patients, suivis selon l'approche de santé publique au Sénégal. Les résultats issus d'études prospectives ont montré un faible taux des mutations de résistance chez les patients infectés par le VIH-1 au Sénégal (**Laurent et coll., 2005 ; Wallis et coll., 2009 ; Tournoud et coll., 2010**). Cette étude transversale chez des patients suivis selon l'approche santé publique, montre un taux élevé (76,39%, soit 55/72) de patients ayant développé au moins une mutation de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 40 mois. Ce taux élevé de résistance a été tout récemment documenté en milieu décentralisé au Sénégal (**Diouara et coll., 2011**), en Afrique Centrale (**Péré et coll., 2012**) et en Afrique du Sud (**El-Khatib et coll., 2010**), pays qui utilisent les mêmes schémas thérapeutiques de 1^{ière} ligne. Cependant, un taux de résistance relativement faible a été documenté au Cameroun après 12 et 24 mois de suivi. Cette différence envers le Cameroun pourrait être expliquée par un temps de suivi différent, plus court au Cameroun (17 mois) (**Kouanfack et coll., 2009**). Une étude a récemment démontré, un taux d'échec virologique faible mais un taux de résistance élevé chez les patients en échec après 36 mois de traitement TARV au Cameroun (**Aghokeng et coll., 2013**). Les taux de résistance chez les patients en échec virologique de 1^{ière} et de 2^{nde} ligne sont respectivement : 72,22 et 88,89%. Pour les patients en 1^{ière} ligne, le taux élevé de résistance est lié aux schémas thérapeutiques incluant les INTIs et les INNTIs (57,41%). Ce résultat explique le besoin de mettre ces patients sous traitement de 2^{nde} ligne, bien que le coût soit plus élevé (**Long et coll., 2010**). Il a été démontré que le changement de schéma thérapeutique est plus opportun dans les sites où la charge virale est disponible (**Keiser et coll., 2009**). Malgré son coût, la charge virale permet d'éviter des changements de lignes non nécessaires et de confirmer le moment idéal pour l'utilisation des molécules de la 2^{nde} ligne (**WHO, 2010**). Cependant, les taux de résistance chez les patients en 2^{nde} ligne sont de 36,84 et 21,05% respectivement pour les combinaisons de molécules associant : INTIs + INNTIs et INTIs + IPs. Ce taux élevé de patients sous 2^{nde} ligne, ayant développé des résistances aux INTIs et INNTIs, est lié à la réémergence des mutations de résistance archivées depuis la 1^{ière} ligne. Ces résultats montrent, un taux élevé des mutations de résistance à la fois chez les patients en 1^{ière} ligne et en 2^{nde} ligne, au moment où les schémas thérapeutiques de 3^{ème} ligne, non seulement plus chers, ne sont pas encore

disponibles dans nos continents. Pour les patients résistants aux schémas de 1^{ière} et de 2^{nde} ligne, la solution alternative consiste à utiliser la classe des IPs boostés ou la seconde génération d'INNTIs, à savoir l'étravirine (**Wallis et coll., 2009**). Dans la politique d'une approche de santé publique avec une augmentation de la circulation des ARVs en Afrique, le monitoring de la survenue des mutations de résistance devient une priorité (**Price et coll., 2011**). En 2011, le Sénégal compte un nombre de 18.352 patients sous ARV, depuis 1998 ([http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_SN_Narrative_Report[1].pdf)) et les données disponibles ont montré un taux élevé des mutations de résistance (**Diouara et coll., 2011**). Les cohortes de patients infectés par le VIH doivent avoir accès à une plateforme de suivi qui permettrait de conserver les schémas thérapeutiques de 1^{ière} ligne pour une longue durée. Il est aussi nécessaire de disposer, dans les pays à ressources limitées, de techniques plus pratiques et moins couteuses pour la charge virale et les tests de résistance aux ARV (**Phillips et coll., 2008 ; Price et coll., 2011**). Parmi les mutations associées à une résistance aux INTIs, nous avons noté une prédominance des TAMs (50,79%) suivies de la mutation M184V/I (34,92%). Des taux élevés de TAMs et de la mutation M184V/I, ont été décrits au Malawi et peuvent être expliqués par la poursuite d'un traitement sous-optimal avant que le test de génotypage ne soit effectué (**Wallis et coll., 2010**). Ces taux élevés d'accumulation des TAMs et de la M184V/I ont été décrits en Afrique du Sud dans une population en échec immunologique ou clinique selon les recommandations de l'OMS. Ces mutations de résistance ont été documentées dans les pays à ressources limitées, où les schémas thérapeutiques de 1^{ière} ligne contiennent l'AZT et la d4T (**Marconi et coll., 2008**). Pour les mutations associées à une résistance aux INNTIs, nous avons noté la prédominance de K103N (46,27%), suivie des mutations aux positions V108, Y181 et K101. Ces taux élevé de la mutation K103N et de résistance aux INNTIs ont été observés à Bangui, chez des adultes après 24 mois de 1^{ière} ligne de traitement ARV (**Péré et coll., 2012**). Contrairement aux mutations associées à une résistance aux INTIs et aux INNTIs, nous avons noté un faible nombre de mutations associées à une résistance aux IPs. Parmi ces mutations, il y avait la prédominance du M46I et L76V, présente chacune à 24%. Ceci montre encore une fois que les schémas thérapeutiques avec IPs boostés constituent une bonne alternative aux INNTIs, quand l'adhérence n'est pas bonne ou le suivi virologique irrégulier, ce qui caractérise la majeure partie des programmes anti-VIH dans les pays à ressources limitées (**Adlington et coll., 2009**).

Cette étude transversale donne aussi un éclairage sur la diversité génétique des souches de VIH-1 qui circulent aux Sénégal. L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 au Sénégal est caractérisée par la prédominance du CRF02_AG (59,72% soit 43/72), la circulation de huit sous-types ou CRFs et de onze URFs, représentant une très grande diversité génétique. La prédominance du CRF02_AG a été documentée dans la population générale (**Peeters et coll., 2010**) mais aussi dans un groupe de travailleuses du sexe (**Hamel et coll., 2007**). La prévalence du sous-type C et des URF est supérieure à celle décrite par Touré-Kane et collaborateurs dans la population générale (**Touré-kane et coll., 2000**) mais, une étude menée sur les MSM a démontré une prévalence élevée du sous-type C (**Diop-Ndiaye et coll., 2009**). Cette diversité génétique peut avoir un impact sur la performance des tests génotypiques qui sont utilisés pour documenter les mutations de résistance aux ARV. Parmi ces tests, nous avons le ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 dont les performances sont liées au succès d'amplification et de séquençage. Cependant, les amorces de cet essai ont été optimisées à partir des VIH-1 de sous-type B (**Eshleman et coll., 2005**). Leur utilisation, dans notre contexte, est souvent confrontée à des échecs d'amplification et/ou de séquençage. Ainsi, notre étude a porté sur l'évaluation des performances de cette technique sur des souches de VIH-1 non-B qui circulent au Sénégal. Les taux d'amplification et de séquençage étaient respectivement de 98% (147/150) et de 96,6% (142/147). Ce taux de séquençage est comparable aux résultats obtenus en Uganda et au Cameroun (**Mracna et coll., 2001 ; Aghokeng et coll., 2011**). Nous avons noté au total un nombre de huit échantillons en échec d'amplification ou de séquençage avec cette technique et leur analyse phylogénétique a montré qu'il s'agissait de CRF02_AG (n=4), A3, (n=2) CRF49_cpx (n=1) et un URF (CRF02_AG/A3). Aucune différence particulière de polymorphisme n'a été notée entre les séquences correspondant à ces échantillons. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la performance de la technique, à savoir : la conservation et la concentration d'acides nucléiques de l'échantillon et les conditions spécifiques de la PCR, ce qui nous empêche de conclure que tout défaut d'amplification ou de séquençage est lié à la diversité génétique du virus (**Eshleman et coll., 2004**). Cependant parmi les huit échantillons en échec, quatre étaient des CRF02_AG et un A3 provenant de patients sous ARV et portant des mutations associées à une résistance aux INTIs et aux INNTIs. Les résultats d'études menées en Belgique et au Cameroun ont montré un seul échec d'amplification en utilisant cette technique (**Maes et coll., 2004 ; Aghokeng et coll., 2011**). L'analyse des performances pour les amorces de séquençage ont montré que l'amorce D avait le taux d'échec le plus élevé (71,4%)

et que la B avait 100% de succès. Des résultats similaires ont été observés sur des souches VIH-1 non-B pour l'amorce D (**Aghokeng et coll., 2011**) et sur des souches B et non-B pour l'amorce B (**Maes et coll., 2004 ; Aghokeng et coll., 2011**). L'amorce D qui a été rajoutée dans le kit initial pour compenser les échecs de séquençage avec l'amorce A n'a pas donné de résultats satisfaisants. En plus de son taux d'échec élevé, particulièrement sur les CRF02_AG et les sous-types C qui prévalent dans notre population d'étude, cette amorce n'est parvenue à amplifier que cinq des dix-huit échantillons en échec avec l'amorce A (27,8% soit 5/18). Les performances des autres amorces (A, C, F, G et H) sont corrélées aux résultats obtenus sur des souches non-B (**Aghokeng et coll., 2011**). Cependant, elles sont différentes de celles reportées sur des souches B, dont les taux de succès varient entre 90 et 99% (**Mracna et coll., 2001 ; Eshleman et coll., 2005**). Le taux d'échec des amorces A, D et H est plus élevé chez le CRF02_AG et le sous-type C, qui co-circulent au Sénégal. Les conséquences seront un génotypage incomplet de la protéase et d'une partie de la transcriptase inverse pour certains patients Sénégalais. Afin de comprendre la cause de ces différences de performance des amorces sur les différents sous-types/CRF, nous avons étudié les différences de polymorphisme entre les souches de VIH-1, sous-type B et non-B au niveau des régions où les amorces A, D et H sont susceptibles de se fixer. Il a été démontré que le polymorphisme est plus élevé chez les non-B. Cependant, aucune différence de polymorphisme n'a été notée entre les souches VIH-1 non-B, pouvant expliquer l'échec ou le succès de séquençage des différentes amorces, comme cela a été aussi décrit au Cameroun (**Aghokeng et coll., 2011**). Cette étude manifeste des limites, dans la mesure où la région exacte de fixation des différentes amorces n'est pas connue car le ViroSeq HIV-1 Genotyping System est une technique commerciale.

A coté de ces problèmes techniques pouvant être rencontrés lors de l'étude des résistances du VIH-1 aux ARV, une conséquence virologique grave non recherchée systématiquement, est la survenue de surinfection dans les couples séroconcordants sous ARV de longue durée, non observant et présentant des mutations de résistance. Nous avons ainsi documenté dans cette étude, la survenue d'un cas de surinfection chez une patiente faisant partie de la cohorte de l'ANRS 1215, cohorte observationnelle incluant les premiers patients sous traitement ARV pendant plus de 10 ans (**Desclaux et coll., 2002**). Les résultats obtenus ont montré un phénomène de surinfection chez une patiente X, dans un contexte de couples séroconcordants. La surinfection a été décrite pour la première fois en 2002 chez les utilisateurs de drogues intraveineuses (**Ramos et coll., 2002**). Ce cas de surinfection dans les couples

séroconcordants interroge sur les mécanismes de transmission sexuelle du VIH. Une étude effectuée au Sénégal a récemment démontré que 74% des couples séroconcordants forment une chaîne de transmission dont le mari est le cas index (**Jennes et coll., 2012**). Les résultats montrent que la patiente était à l'origine infectée par le VIH-1 de sous-type G. Par la suite, nous avons trouvé un recombinant G/CRF18_cpx. Cela signifie qu'elle a été infectée par un nouveau virus CRF18_cpx qui a recombiné avec le sous-type G d'origine pour donner un URF, G/CRF18_cpx chez la patiente. Il a été démontré que, la recombinaison est la conséquence directe des phénomènes de co-infection et surinfection, favorisant la diversité génétique du VIH-1 dans le monde (**Fang et coll., 2004**). La patiente a acquis le CRF18_cpx de son conjoint Y qui est porteur de ce variant depuis 2007 à travers des voyages qu'il a effectué dans les zones où circule le CRF18_cpx (**Thomson et coll., 2005**). La période probable où la surinfection aurait eu lieu, est supposée entre 2007 et 2009, période pendant laquelle la patiente avait un défaut d'observance. Jost et collaborateurs ont montré la présence d'une recombinaison AE/B à la suite d'une surinfection occasionnée par un défaut d'observance (**Jost et coll., 2002**). Cette période de surinfection coïncide aussi avec un rebond virologique et un déclin du taux de lymphocytes CD4 (**Blackard et Mayer, 2004**). Ce rebond virologique et le déclin du taux de CD4 sont les conséquences d'une forte réPLICATION virale et d'une augmentation de la virulence du virus, qui sera à l'origine de la progression rapide vers la phase SIDA (**Jost et coll., 2002**). Au cours de cette période de mauvaise observance pendant laquelle la surinfection aurait eu lieu, nous notons aussi la présence de mutations majeures de résistance aux INNTIs. Il a été prouvé que ces phénomènes de résistance deviennent plus graves dans le cas des surinfections entre deux virus déjà résistants, avec la formation d'un recombinant doublement résistant (**Levy, 2003 ; Blick et coll., 2007**). La surinfection et la recombinaison qui peut en découler sont des obstacles potentiels au développement de vaccins et compromettent l'efficacité des molécules antirétrovirales surtout dans le cas des virus résistants (**Levy, 2003**).



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les molécules antirétrovirales ont été développées pour freiner l'évolution de l'épidémie du VIH dans le monde. Le Sénégal, à travers l'ISAARV, a développé un programme d'accès aux ARV (**Desclaux et coll., 2002**). Il a été démontré que le traitement antirétroviral réduit le risque de transmission de l'infection à VIH, mais aussi diminue la morbidité et la mortalité liées à l'infection VIH/SIDA (**Palella et coll., 1998**). Cependant, la gestion du traitement antirétrovirale et de l'infection à VIH est très complexe et demeure un problème tout entier, dépendant de plusieurs facteurs parmi lesquels : un bon suivi de l'efficacité des ARV, un suivi de la tolérance et de la toxicité des ARV, une évaluation périodique des échecs thérapeutiques et de l'émergence des mutations de résistance (**Tourmond et coll., 2010 ; Tsibris et Hirsch, 2010**). Le Sénégal a initié le traitement antirétroviral depuis 1998. Les premières évaluations de l'efficacité de cette initiative ont été effectuées entre 18 et 30 mois après la mise en oeuvre (**Laurent et coll., 2002 ; Laurent et coll., 2005**). Il s'avère important de les compléter par :

- une évaluation de l'efficacité dans le long terme sur des cohortes observationnelles comme celle de l'ANRS 1215 et à l'échelle programmatique chez les patients suspects d'échec clinique ou immunologique
- une étude de performances des techniques commerciales comme le ViroSeq, utilisé dans le contexte Sénégalais,
- et une étude sur l'apparition de surinfections dans les couples séroconcordants qui est une des conséquences de l'émergence de la résistance.

Les données issues de la cohorte observationnelle de l'ANRS 1215, montrent un succès virologique chez les patients en 1^{ière} ligne avec 80%. Cependant, l'échec virologique chez les patients en 2^{nde} ligne montre la nécessité de disposer d'un schéma thérapeutique de troisième ligne dans les pays à ressources limitées. Cette étude fait partie des premières dans les pays à ressources limitées, à documenter le taux d'échec virologique et le développement de mutations de résistance pour des patients suivis sur une longue durée. A coté de cette cohorte structurée, l'étude transversale réalisée chez des patients suivis selon l'approche de santé publique, a montré un taux élevé (76,39%, soit 55/72) de patients ayant développé au moins une mutation de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 40 mois. Les taux de résistance chez les patients en échec virologique de 1^{ière} et de 2^{nde} ligne sont respectivement : 72,22 et 88,89%. Malgré sa population d'étude relativement faible, cette étude pose le problème d'une prévalence élevée de résistances aux ARV et une accumulation des TAMs quand la charge virale n'est pas effectuée régulièrement. Ces résultats montrent la nécessité

d'améliorer le monitoring virologique des patients sous ARV dans les pays à ressources limitées, particulièrement au Sénégal, pays à épidémie concentrée et une grande diversité génétique du VIH-1, avec une prédominance du CRF02_AG. Cette diversité génétique peut influencer la qualité des tests génotypiques utilisés pour documenter les mutations de résistance du VIH-1 aux ARV. Parmi ces tests, nous avons le ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0, dont les performances sont liées à l'efficacité des différentes amores utilisées pour la PCR et les réactions de séquence. L'évaluation des performances de cette technique sur des souches de VIH-1 non-B, qui circulent au Sénégal, montre un taux d'amplification et de séquençage qui sont respectivement de 98% (147/150) et de 96,6% (142/147). L'analyse des performances pour les amores de séquençage ont montré que l'amorce D avait le taux d'échec le plus élevé (71,4%) et que la B avait 100% de succès. Aucune différence de polymorphisme entre les souches non-B pouvant expliquer l'échec du séquençage pour une amorce donnée, mais les résultats montrent la nécessité de mieux considérer les souches de VIH-1 non-B dans l'évaluation des tests de génotypage. Des études ont démontré que la thérapeutique antirétrovirale, à long terme non efficace due, à un défaut d'observance ou à l'apparition de mutations de résistance, peut favoriser la survenue de surinfections chez les populations clés comme chez les couples séroconcordants (**Blackard et Mayer, 2004 ; Blick et coll., 2007**). Nous avons documenté la survenue d'une surinfection chez une patiente appartenant à un couple séroconcordant de la cohorte de l'ANRS 1215, cohorte observationnelle incluant les premiers patients sous traitement ARV pendant plus de 10 ans (**Desclaux et coll., 2002**). La période probable où la surinfection aurait eu lieu est supposée entre 2007 et 2009, période pendant laquelle la patiente présentait un défaut d'observance. Il a été documenté que la surinfection était liée à un défaut d'observance chez des patients sous HAART. Au cours de cette période de mauvaise observance pendant laquelle la surinfection aurait eu lieu, des mutations majeures de résistance aux INNTIs ont été détectées. Ces mutations de résistance étaient absentes avant la surinfection, ce qui montre un lien entre ce phénomène de surinfection et le développement des mutations de résistance aux ARV. Cette étude met l'accent sur le risque de nouvelles transmissions dans les couples séroconcordants, dont l'impact peut être important en termes de procréation et de santé publique. Elle montre aussi l'importance d'un suivi régulier, la nécessité d'un dispositif d'aide à l'observance et plus généralement, la complexité de la prise en charge des patients infectés par le VIH-1.

Les quatre axes de recherche que nous avons suivis nous ont permis de dégager les points essentiels suivants:

- pour les patients suivis selon l'approche standard ou de santé publique, le taux d'échec virologique est associé à une prévalence élevée des mutations de résistance aux ARV,
- les techniques utilisées pour l'étude des mutations de résistance aux ARV doivent être revalidées en tenant compte des souches non-B qui prédominent au Sénégal,
- un suivi thérapeutique irrégulier ou sous-optimal peut augmenter les risques d'échec thérapeutique et entraîner des évènements de surinfection qui favorisent la diversité virale

Les résultats de ces travaux permettent de recommander un renforcement du suivi virologique afin de maintenir les patients sous première ligne et d'éviter l'accumulation des mutations de résistance pouvant compromettre les choix de la thérapie de 2^{nde} ligne. Ainsi les bailleurs et décideurs au niveau national doivent mettre en place des plateformes de suivi virologique, bien structurées pour mieux accompagner la prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH, dans les pays à ressources limitées comme le Sénégal. A côté de ces équipements lourds et indispensables au niveau national, il est possible de renforcer la plateforme biologique par la mise à disposition de techniques de charge virale et de numération du taux de CD4 en milieu décentralisé. Les supports de prélèvements sur du papier de sang séché (DBS), constituent une bonne alternative pour le suivi biologique en milieu décentralisé. A défaut de disposer d'une plateforme de charge virale dans ces zones décentralisées, les programmes sanitaires devront renforcer la logistique pour que les DBS puissent être utilisés et envoyés aux laboratoires de référence dans les meilleurs délais. L'utilisation de ces DBS en milieu décentralisé permettrait, non seulement d'améliorer le suivi virologique dans tout le pays par la charge virale et l'étude des mutations de résistance mais aussi, de mieux documenter la diversité génétique des souches de VIH-1 qui circulent au Sénégal. Le laboratoire et le chercheur vont accompagner ces plateformes par la mise à disposition de techniques de mesure de la charge virale moins coûteuses et plus accessibles, et des techniques de génotypage plus adaptées aux souches de VIH-1 non-B. Enfin, l'équipe clinique devra intégrer le suivi virologique, en rapport avec la clinique et les autres aspects du suivi biologique de la bonne prise en charge des personnes vivant avec le VIH.

En perspective, la mise en place de projets de surveillance des résistances acquises serait donc indispensable, dans la mesure où le premier projet dénommé ANRS 1215, qui était le seul à fournir d'importantes informations sur le traitement ARV et le suivi virologique des premiers patients inclus dans l'ISAARV, est arrivé à son terme. Cette surveillance est inévitable selon l'objectif de l'OMS qui consiste à rendre plus accessible le traitement ARV partout dans le

monde. Le taux de résistance élevé dans la population suivie selon l'approche de santé publique, justifie la nécessité de mettre en place un suivi standardisé et un monitoring plus régulier. Le taux de résistances chez les patients en 2^{nde} ligne montre la nécessité de disposer des schémas thérapeutiques de 3^{ième} ligne dans les pays à ressources limitées. La robustesse des IPs et leur utilisation comme alternative aux INNTIs, montrent la nécessité de mettre en place des projets de monitoring de la résistance transmise, surtout pour les mutations relatives aux IPs. La surveillance des résistances transmises comme celles dites acquises, peut se faire à l'aide de projets multicentrique à travers les réseaux de recherche dont le Sénégal est membre ; parmi ces réseaux nous pouvons citer le RARS, WANETAM et WAPHIR. Il serait aussi important d'évaluer la réponse virologique chez des patients sous 3^{ième} ligne, plus particulièrement les mutations de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase. Du fait de la grande diversité génétique du VIH-1 chez les populations clés et les couples séroconcordants, nous constatons souvent des phénomènes de recombinaison à la suite d'une surinfection. La recombinaison génétique augmente la variabilité des souches de VIH-1 mais aussi les conséquences sur le suivi thérapeutique des patients infectés par le VIH-1. Ces facteurs montrent la nécessité de mieux documenter le risque de nouvelles transmissions et la survenue de surinfections chez les populations clés ainsi que les couples séroconcordants au Sénégal.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abraham A, Lau B, Deeks S, Moore RD, Zhang J, Eron J, Harrigan R, Gill MJ, Kitahata M, Klein M, Napravnik S, Rachlis A, Rodriguez B, Rourke S, Benson C, Bosch R, Collier A, Gebo K, Goedert J, Hogg R, Horberg M, Jacobson L, Justice A, Kirk G, Martin J, McKaig R, Silverberg M, Sterling T, Thorne J, Willig J, Gange SJ; North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design of the International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS.: **Missing data on the estimation of the prevalence of accumulated human immunodeficiency virus drug resistance in patients treated with antiretroviral drugs in North America.** *Am J Epidemiol* 2011, **174**(6):727-735.
2. Abram M, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH.: **Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication.** *J Virol* 2010, **84**(19):9864-9878.
3. Adamson CS: **Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process.** *Mol Biol Int* 2012, **2012**:604261.
4. Adlington R, Richens J, Shahmanesh M: **First-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: time to reconsider?** *J Infect Dis* 2009, **199**(9):1407-1408.
5. Aghokeng A, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M.: **High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**(4):1635-1641.
6. Aghokeng A, Kouanfack C, Eymard-Duvernay S, Butel C, Edoul GE, Laurent C, Koulla-Shiro S, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Peeters M.: **Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon.** *J Int AIDS Soc* 2013, **16**:18004.
7. Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, Cutrell A, Fischl M A, Clumeck N, Greenberg S B, Rubio R, Peters B S, Pulido F, Gould J, Pearce G, Spreen W, Tisdale M, Lafon S: **Mutations in HIV-1 reverse transcriptase during therapy with abacavir, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected adults with no prior antiretroviral therapy; CNA3003 International Study Team.** *Antivir Ther* 2002, **7**(1):43-51.
8. Ajose O, Mookerjee S, Mills EJ, Boulle A, Ford N.: **Treatment outcomes of patients on second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis.** *AIDS* 2012, **26**(8):929-938.
9. Akouamba B, Viel J, Charest H, Merindol N, Samson J, Lapointe N, Brenner BG, Lalonde R, Harrigan PR, Boucher M, Soudeyns H: **HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(8):1230-1234.
10. Alcaro S, Alteri C, Artese A, Ceccherini-Silberstein F, Costa G, Ortuso F, Parrotta L, Perno CF, Svicher V.: **Molecular and structural aspects of clinically relevant mutations related to the approved non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase.** *Drug Resist Updat* 2011, **14**(3):141-149.
11. Allouch A, Di Primio C, Alpi E, Lusic M, Arosio D, Giacca M, Cereseto A.: **The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration.** *Cell Host Microbe* 2011, **9**(6):484-495.
12. Al-Mawsawi L, Al-Safi RI, Neamati N.: **Anti-infectives: clinical progress of HIV-1 integrase inhibitors.** *Expert Opin Emerg Drugs* 2008, **13**(2):213-225.
13. Al-Mawsawi LQ, Neamati N.: **Blocking interactions between HIV-1 integrase and cellular cofactors: an emerging anti-retroviral strategy.** *Trends Pharmacol Sci* 2007, **28**(10):526-535.

14. Andersen E, Contera SA, Knudsen B, Damgaard CK, Besenbacher F, Kjems J.: **Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA.** *J Biol Chem* 2004, **279**(21):22243-22249.
15. Anderson J, Rodrigo AG, Learn GH, Madan A, Delahunty C, Coon M, Girard M, Osmanov S, Hood L, Mullins JI.: **Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E.** *J Virol* 2000, **74**(22):10752-10765.
16. Argyris EG, Pomerantz RJ.: **HIV-1 Vif versus APOBEC3G: newly appreciated warriors in the ancient battle between virus and host.** *Trends Microbiol* 2004, **12**(4):145-148.
17. Arhel N, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Charneau P.: **HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore.** *EMBO J* 2007, **26**(12):3025-3037.
18. Arora V, Frederickson BL, Garcia JV.: **Nef: agent of cell subversion.** *Microbes Infect* 2002, **4**(2):189-199.
19. Arrildt K, Joseph SB, Swanstrom R.: **The HIV-1 env protein: a coat of many colors.** *Curr HIV/AIDS Rep* 2012, **9**(1):52-63.
20. Arthur L, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE: **Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines.** *Science* 1992, **258**(5090):1935-1938.
21. Ashish GR, Anguita J, Krueger JK.: **Binding of full-length HIV-1 gp120 to CD4 induces structural reorientation around the gp120 core.** *Biophys J* 2006, **91**(6):L69-71.
22. Ayouba A, Souquières S, Njinku B, Martin PM, Müller-Trutwin MC, Roques P, Barré-Sinoussi F, Mauclère P, Simon F, Nerrienet E.: **HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon.** *AIDS* 2000, **14**(16):2623-2625.
23. Ayouba A, Mauclère P, Martin PM, Cunin P, Mfoupouendoun J, Njinku B, Souquières S, Simon F.: **HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**(3):466-467.
24. Ayouba A, Akoua-Koffi C, Adjogoua EV, Calvignac S, Esteban A, Locatelli S, Delaporte E, Leendertz FH, Peeters M.: **Identification of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire: an additional cross-species transmission from SIVsmm from sooty mangabeys to humans.** In: *CROI 2012*. vol. Abstract LB 62. Atlanta; 2013.
25. Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA.: **Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor.** *J Biol Chem* 1999, **274**(13):9083-9091.
26. Bacheler L, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, Bolling L, Aujay M, Wang XV, Ellis D, Becker MF, Lasut AL, George HJ, Spalding DR, Hollis G, Abremski K.: **Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**(9):2475-2484.
27. Bacheler L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, Cordova B, Hertogs K, Larder B, Buckery R, Baker D, Gallagher K, Scarnati H, Tritch R, Rizzo C: **Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy.** *J Virol* 2001, **75**(11):4999-5008.
28. Bakhanashvili M, Novitsky E, Levy I, Rahav G.: **The fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increases in the presence of polyamines.** *FEBS Lett* 2005, **579**(6):1435-1440.

29. Baleux F, Loureiro-Morais L, Hersant Y, Clayette P, Arenzana-Seisdedos F, Bonnaffé D, Lortat-Jacob H.: **A synthetic CD4-heparan sulfate glycoconjugate inhibits CCR5 and CXCR4 HIV-1 attachment and entry.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**(10):743-748.
30. Balzer S, Malde K, Lanzén A, Sharma A, Jonassen I. : **Characteristics of 454 pyrosequencing data—enabling realistic simulation with flowsim.** *Bioinformatics* 2010, **26**(18):i420-i425.
31. Barlow K, Green J and Clewley JP.: **Viral genome characterisation by the heteroduplex mobility and heteroduplex tracking assays.** *Rev Med Viral* 2000, **10**:321-335.
32. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** 1983. *Science* 1983, **220**(4599):868-871.
33. Barth R, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM.: **Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review.** *Lancet Infect Dis* 2010, **10**(3):155-166.
34. Bártno I, Rocha C, Bartolomeu J, Gama A, Marcelino R, Fonseca M, Mendes A, Epalanga M, Silva PC, Taveira N.: **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* 2009, **9**(4):672-682.
35. Bártno I, Casanovas J, Bastos R, Rocha C, Abecasis AB, Folgosa E, Mondlane J, Manuel R, Taveira N.: **HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance in health care settings in Maputo, Mozambique.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, **51**(3):323-331.
36. Basu V, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA.: **Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription.** *Virus Res* 2008, **134**(1-2):19-38.
37. Battiste J, Mao H, Rao NS, Tan R, Muhandiram DR, Kay LE, Frankel AD, Williamson JR.: **Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex.** *Science* 1996, **273**(5281):1547-1551.
38. Bauby H, Lopez-Vergès S., Berlioz-Torrent C.: **TIP47, un cofacteur cellulaire essentiel à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la particule virale.** *Virologie* 2008, **12**(3):201-213.
39. Beddows S, Galpin S, Kazmi SH, Ashraf A, Johargy A, Frater AJ, White N, Braganza R, Clarke J, McClure M, Weber JN.: **Performance of two commercially available sequence-based HIV-1 genotyping systems for the detection of drug resistance against HIV type 1 group M subtypes.** *J Med Virol* 2003, **70**(3):337-342.
40. Berger E, Murphy PM, Farber JM.: **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:657-700.
41. Berkhout B: **Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996, **54**:1-34.
42. Berkhout B: **The primer binding site on the RNA genome of human and simian immunodeficiency viruses is flanked by an upstream hairpin structure.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(20):4013-4017.
43. Berkhout B, Vastenhoudt NL, Klasens BI, Huthoff H.: **Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription.** *RNA* 2001, **7**(8):1097-1114.
44. Bethell R, De Muys J, Lippens J, Richard A, Hamelin B, Ren C, Collins P.: **In vitro interactions between apricitabine and other deoxycytidine analogues.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(8):2948-2953.

45. Bigaillon C, Mérens A, Rapp C.: **Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne.** *Rev Francoph laborat* 2010, **2010**(422):69-82.
46. Blackard J, Cohen DE, Mayer KH.: **Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**(8):1108-1114.
47. Blackard JT, and Mayer KH.: **HIV superinfection in the era of increased sexual risk-taking.** *Sex Transm Dis* 2004, **31**(4):201-204.
48. Blanco J, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer RW.: **HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications.** *J Infect Dis* 2011, **203**(9):1204-1214.
49. Blick G, Kagan RM, Coakley E, Petropoulos C, Maroldo L, Greiger-Zanlungo P, Gretz S, Garton T.: **The probable source of both the primary multidrug-resistant (MDR) HIV-1 strain found in a patient with rapid progression to AIDS and a second recombinant MDR strain found in a chronically HIV-1-infected patient.** *J Infect Dis* 2007, **195**(9):1250-1259.
50. Bochner R, Duvshani A, Adir N, Hizi A.: **Mutagenesis of Gln294 of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-2 and its effects on the ribonuclease H activity.** *FEBS Lett* 2008, **582**(18):2799-2805.
51. Boden DaMM: **Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors.** *Antimicrob Agents Chemother* 1998, **42**(11):2775-2783.
52. Bonnard P, and Pialoux G.: **Astualisation des données cliniques concernant les inhibiteurs d'intégrase.** *Virologie* 2009, **13**:S43-S49.
53. Boulanger P, Jones I.: **Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, **214**:237-260.
54. Boyer PL, Sarafianos S G, Arnold E, Hughes S H: **The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1.** *J Virol* 2002, **76**(7):3248-3256.
55. Brady J, Kashanchi F.: **Tat gets the "green" light on transcription initiation.** *Retrovirology* 2005, **2**:69.
56. Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F, Schechter M, Boulle A, Miotti P, Wood R, Laurent C, Sprinz E, Seyler C, Bangsberg DR, Balestre E, Sterne JA, May M, Egger M; Antiretroviral Therapy in Lower Income Countries (ART-LINC) Collaboration; ART Cohort Collaboration (ART-CC) groups.: **Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries.** *Lancet* 2006, **367**(9513):817-824.
57. Brandt S, Blissenbach M, Grewe B, Konietzny R, Grunwald T, Uberla K: **Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation.** *PLoS Pathog* 2007, **3**(4):e54.
58. Brennan C, Bodelle P, Coffey R, Devare SG, Golden A, Hackett J Jr, Harris B, Holzmayer V, Luk KC, Schochetman G, Swanson P, Yamaguchi J, Vallari A, Ndembí N, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Gürtler LG, Zekeng L, Kaptué L.: **The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008, **49**(4):432-439.
59. Brenner BG: **Resistance and viral subtypes: how important are the differences and why do they occur?** *Curr Opin HIV AIDS* 2007, **2**(2):94-102.
60. Brown P, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM.: **Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(8):2525-2529.

61. Brun-Vézinet F, Masquelier B, Calvez V, Chaix M-L, Costagliola D, Descamps D, Izopet J, Ruffault A, Tamalet C, et le groupe AC11 Résistance de l'Agence nationale de recherche sur le sida.: **L'interprétation des tests génotypiques de résistance aux antirétroviraux.** *Virologie* 2001, **5**(Numéro spécial):29-33.
62. Cabrera C MS, García E, Martínez-Picado J, Bonjoch A, Bofill M, Moreno S, Ribera E, Domingo P, Clotet B, Ruiz L.: **Genetic evolution of gp41 reveals a highly exclusive relationship between codons 36, 38 and 43 in gp41 under long-term enfuvirtide-containing salvage regimen.** *AIDS* 2006, **20**(16):2075-2080.
63. Cahn P, and Wainberg MA.: **Resistance profile of the new nucleoside reverse transcriptase inhibitor apricitabine.** *J Antimicrob Chemother* 2010, **65**(2):213-217.
64. Campbell T, Smeaton L, De Grutolla V.: **PEARLS (ACTG A5175): a multinational study of didanosine-EC, emtricitabine and atazanavir vs. co-formulated zidovudine/lamivudine and efavirenz for initial treatment of HIV-1 infection.** In: *XVII International AIDS Conference 2008*. Mexico; 2008.
65. Cancio R, Spadari S, Maga G.: **Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass.** *Biochem J* 2004, **383**(Pt. 3):475-482.
66. Carlson L, Briggs JA, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Müller B, Grünewald K, Kräusslich HG.: **Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis.** *Cell Host Microbe* 2008, **4**(6):592-599.
67. Carstensen B: **Regression models for interval censored survival data: application to HIV infection in Danish homosexual men.** *Stat Med* 1996, **15**(20):2177-2189.
68. Casado JL, Hertogs K, Ruiz L, Dronda F, Van Cauwenberge A, Arnó A, Garcia-Arata I, Bloor S, Bonjoch A, Blazquez J, Clotet B, Larder B: **Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen.** *AIDS* 2000, **14**(2):F1-7.
69. Cases-González C, Menéndez-Arias L.: **Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114.** *Biochem J* 2005, **387**(Pt 1):221-229.
70. Centers for Disease Control and Prevention: **Pneumocystis Pneumonia.** *Los Angeles MMWR Weekly* 1981, **30**(21):250-252.
71. Chan D, Fass D, Berger JM, Kim PS.: **Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.** *Cell* 1997, **89**(2):263-273.
72. Chazal N, Carrière C, Gay B, Boulanger P.: **Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells.** *J Virol* 1994, **68**(1):111-122.
73. Chazal N, Singer G, Aiken C, Hammarskjöld ML, Rekosh D.: **Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity.** *J Virol* 2001, **75**(8):4014-4018.
74. Chazal N: **Assemblage, bourgeonnement et maturation de VIH-1.** *Virologie* 2005, **9**:215-227.
75. Checkley M, Luttge BG, Freed EO.: **HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation.** *J Mol Biol* 2011, **410**(4):582-608.
76. Chen J, Krucinski J, Miercke LJ, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, Stroud RM.: **Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(15):8233-8238.
77. Chen J, Wong KH, Chan K, Lam HY, Lee SS, Li P, Lee MP, Tsang DN, Zheng BJ, Yuen KY, Yam WC.: **Evaluation of an in-house genotyping resistance test for**

- HIV-1 drug resistance interpretation and genotyping.** *J Clin Virol* 2007, **39**(2):125-131.
78. Cihlar T, and Ray AS.: **Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine.** *Antiviral Res* 2010, **85**(1):39-58.
79. Cimarelli A, and Darlix JL.: **Assembling the human immunodeficiency virus type 1.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(7):1166-1184.
80. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M.: **Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2.** *Nature* 1986, **324**(6098):691-695.
81. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strelbel K, Martin MA, Repaske R: **Genetic recombination of human immunodeficiency virus.** *J Virol* 1989, **63**(3):1455-1459.
82. Clever J, Miranda D Jr, Parslow TG.: **RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome.** *J Virol* 2002, **76**(23):12381-12387.
83. Clotet B, Katlama C, Lalezari J, Young B, Huang J, Underwood MR, Ait-Khaled M, Nichols WG.: **HIV integrase resistance profiles and S/GSK1349572 baseline phenotypic susceptibility for subjects experiencing virologic failure on raltegravir (RAL) in the VIKING study (ING112961).** *Antivir Ther* 2010, **15**:A61.
84. Coffin J, Hughes SH, and Varmus HE.: **Retroviruses.** New York; 1997.
85. Coffin J, Essex M, Gallo R, Graf TM, Hinuma Y, Hunter E.: **Retroviridae with ICTV report.** http://lifebio2edu/Ictv/fs_retrohtml 2003.
86. Cohen E, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA.: **Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1.** *Nature* 1988, **334**(6182):532-534.
87. Cohen G, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D.: **The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells.** *Immunity* 1999, **10**(6):661-671.
88. Collinson-Streng A, Redd AD, Sewankambo NK, Serwadda D, Rezapour M, Lamers SL, Gray RH, Wawer MJ, Quinn TC, Laeyendecker O.: **Geographic HIV type 1 subtype distribution in Rakai district, Uganda.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009, **25**(10):1045-1048.
89. Conticello S, Harris RS, Neuberger MS.: **The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G.** *Curr Biol* 2003 **13**(22):2009-2013.
90. Copeland TD, Oroszlan S.: **Genetic locus, primary structure, and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease.** *Gene Anal Tech* 1988, **5**(6):109-115.
91. Cosnefroy O, Tocco A, Lesbats P, Thierry S, Calmels C, Wiktorowicz T, Reigadas S, Kwon Y, De Cian A, Desfarges S, Bonot P, San Filippo J, Litvak S, Cam EL, Rethwilm A, Fleury H, Connell PP, Sung P, Delelis O, Andréola ML, Parissi V.: **Stimulation of the human RAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration in vitro and in infected cells.** *J Virol* 2012, **86**(1):513-526.
92. Costin JM: **Cytopathic mechanisms of HIV-1.** *Virol J* 2007(4):100.
93. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S, Lundgren JD; EuroSIDA Study Group: **Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy.** *Antivir Ther* 2005, **10**(7):791-802.
94. Cozzi-Lepri A, Phillips A N, Martinez-Picado J, Monforte A, Katlama C, Eg Hansen A B, Horban A, Bruun J, Clotet B, Lundgren J D: **Rate of Accumulation of**

- Thymidine Analogue Mutations in Patients Continuing to Receive Virologically Failing Regimens Containing Zidovudine or Stavudine: Implications for Antiretroviral Therapy Programs in Resource-Limited Settings; EuroSIDA Study Group.** *J Infect Dis* 2009, **200**(5):687-697.
95. Cuevas M, Fernandez-Garcia A, Sanchez-Garcia A, Gonzalez-Galeano M, Pinilla M, Sanchez-Martinez M, Garcia V, Perez-Alvarez L; Study group of HIV-1 newly diagnosed patients in Galicia, Spain: **Incidence of non-B subtypes of HIV-1 in Galicia, Spain: high frequency and diversity of HIV-1 among men who have sex with men.** *Euro Surveill Nov 26;()* 2009, **14**(47):pii: 19413.
 96. Cunningham S, Ank B, Lewis D, Lu W, Wantman M, Dileanis JA, Jackson JB, Palumbo P, Krogstad P, Eshleman SH.: **Performance of the applied biosystems ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(4):1254-1257.
 97. Daly T, Cook, KS, Gran, GS, Maione, TE and Rusche JR.: **Speci®c binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-response element in vitro.** *Nature* 1989, **342**:816-819.
 98. Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vézinet F, Robertson DL, Simon F: **Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**(6):666-672.
 99. Damond FeDD: **Résistance du VIH aux antirétroviraux : évaluations virologiques des thérapeutiques.** 1998, **1998**(305):51-55.
 100. Danial NN, and Korsmeyer SJ.: **Cell death: critical control points.** *Cell* 2004, **116**(2):205-219.
 101. Danner S, Carr A, Leonard JM, Lehman LM, Gudiol F, Gonzales J, Raventos A, Rubio R, Bouza E, Pintado V. for the European–Australian Collaborative Ritonavir Study Group: **A short-term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease.** *European-Australian Collaborative Ritonavir Study Group.* *N Engl J Med* 1995, **333**(23):1528-1533.
 102. Darke P, Nutt RF, Brady SF, Garsky VM, Ciccarone TM, Leu CT, Lumma PK, Freidinger RM, Veber DF, Sigal IS: **HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 1988, **156**(1):297-303.
 103. De Beaudrap P, Etard JF, Diouf A, Ndiaye I, Ndèye GF, Sow PS, Ndèye KC, Ecochard R, Delaporte E; ANRS 1215 Study Group: **Incidence and determinants of new AIDS-defining illnesses after HAART initiation in a Senegalese cohort.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:179.
 104. De Clercq E: **The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection.** *Antiviral Res* 1998, **38**(3):153-179.
 105. de Marco A, Davey NE, Ulbrich P, Phillips JM, Lux V, Riches JD, Fuzik T, Ruml T, Kräusslich HG, Vogt VM, Briggs JA: **Conserved and variable features of Gag structure and arrangement in immature retrovirus particles.** *J Virol* 2010, **84**(22):11729-11736.
 106. Deeks SG: **International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001, **26**(Suppl 1):S25-S33.
 107. Delaporte E, Janssens W, Peeters M, Buvé A, Dibanga G, Perret JL, Ditsambou V, Mba JR, Courbot MC, Georges A, Bourgeois A, Samb B, Henzel D, Heyndrickx L,

- Fransen K, van der Groen G, Larouzé B.: **Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994.** *AIDS* 1996, **10**(8):903-910.
108. Delaugerre C, Chaix ML, Warszawski J, Rouzioux C, Blanche S.: **La résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les enfants infectés : du nouveau-né à l'adolescent.** *Archives de pédiatrie* 2007, **14**:298-302.
109. Delgado E, Thomson MM, Villahermosa ML, Sierra M, Ocampo A, Miralles C, Rodríguez-Pérez R, Diz-Aren J, Ojea-de Castro R, Losada E, Cuevas MT, Vázquez-de Parga E, Carmona R, Pérez-Alvarez L, Medrano L, Cuevas L, Taboada JA, Nájera R.: **Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, **29**(5):536-543.
110. Delwart E, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. **Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays.** *J Virol* 1994, **68**(10):6672-6683.
111. Descamps D, Collin G, Letourneur F, Apetrei C, Damond F, Loussert-Ajaka I, Simon F, Saragosti S, Brun-Vézinet F.: **Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses.** *J Virol* 1997, **71**(11):8893-8898.
112. Descamps D, Chaix ML, André P, Brodard V, Cottalorda J, Deveau C, Harzic M, Ingrand D, Izopet J, Kohli E, Masquelier B, Mouajjah S, Palmer P, Pellegrin I, Plantier JC, Poggi C, Rogez S, Ruffault A, Schneider V, Signori-Schmück A, Tamalet C, Wirden M, Rouzioux C, Brun-Vézinet F, Meyer L, Costagliola D: **French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001-2002.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **38**(5):545-552.
113. Descamps D, Lambert-Niclot S, Marcellin AG, Peytavin G, Roquebert B, Katlama C, Yeni P, Felices M, Calvez V, Brun-Vézinet F.: **Mutations associated with virological response to darunavir/ritonavir in HIV-1-infected protease inhibitor-experienced patients.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**(3):585-592.
114. Desclaux A, Lanièce I, Ndoye I, Taverne B, eds.: **The Senegalese Antiretroviral Drug Access Initiative. An Economic, Social, Behavioural and Biomedical Analysis.** Paris: ANRS, UNAIDS, WHO 2002.
115. Desfarges S, San Filippo J, Fournier M, Calmels C, Caumont-Sarcos A, Litvak S, Sung P, Parissi V.: **Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(21):6215-6224.
116. Deshpande A, Jauvin V, Pinson P, Jeannot AC, Fleury HJ.: **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* 2009, **25**(6):633-635.
117. DiMatta MA, Watts NR, Stahl SJ, Rader C, Wingfield PT, Stuart DI, Steven AC, Grimes JM.: **Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(13):5810-5814.
118. Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Vidal N, Niama FR, Niang-Diallo PA, Dieye T, Gaye-Diallo A, Wade AS, Peeters M, MBoup S.: **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* 2009, **52**(2):249-252.

119. 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* 2010, **26**(10):1133-1138.
120. Diouara A, Kebe K, Diop-Ndiaye H, Thiam M, Leye N, Diallo S, Thiackpe E, Diallo A, Faye M, Sakine M, Ouattara B, Diouf S, Toure-Kane C, Mboup S.: **Apport du papier buvard dans le génotypage du VIH-1 en milieu décentralisé au Sénégal.** *16ème Conférence Internationale sur le Sida et les IST en Afrique, Addis Abeba Ethiopie 2011, Numéro : WEAA0504.*
121. Djoko C, Rimoin AW, Vidal N, Tamoufe U, Wolfe ND, Butel C, LeBreton M, Tshala FM, Kayembe PK, Muyembe JJ, Edidi-Basepeo S, Pike BL, Fair JN, Mbacham WF, Saylors KE, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Grillo M, Peeters M.: **High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011, **27**(3):323-329.
122. Dobard C, Briones MS, Chow SA.: **Molecular mechanisms by which human immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse transcription.** *J Virol* 2007, **81**(18):10037-10046.
123. Doms RW, and Peiper SC.: **Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry.** *Virology* 1997, **235**(2):179-190.
124. Donaghy H, Wilkinson J., Cunningham A.L.: **HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow?** *J Leukoc Biol* 2006, **80**(5):1001-1012. .
125. D'Orso I, and Frankel AD.: **HIV-1 Tat: Its Dependence on Host Factors is Crystal Clear.** *Viruses* 2010, **2**(10):2226-2234.
126. Dronda F, Casado JL, Moreno S, Hertogs K, García-Arata I, Antela A, Pérez-Elías MJ, Ruiz L, Larder B; NELSANE Study.: **Phenotypic cross-resistance to nelfinavir: the role of prior antiretroviral therapy and the number of mutations in the protease gene.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001, **3**(17):211-215.
127. Dwyer J, Wilson KL, Davison DK, Freel SA, Seedorff JE, Wring SA, Tvermoes NA, Matthews TJ, Greenberg ML, Delmedico MK.: **Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(31):12772-12777.
128. Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, Davies DR.: **Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases.** *Science* 1994, **266**(5193):1981-1986.
129. Dykes C, Fox K, Lloyd A, Chiulli M, Morse E, Demeter LM.: **Impact of clinical reverse transcriptase sequences on the replication capacity of HIV-1 drug-resistant mutants.** *Virology* 2001, **285**(2):193-203.
130. Easterbrook P, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, Tatt ID, Geretti AM, Zuckerman M.: **Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy.** *J Int AIDS Soc* 2010, **13**:4.
131. Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y.: **Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA.** *Microbes Infect* 2004, **6**(8):715-724.
132. Efron B, and Tibshirani R.: **An introduction to the bootstrap:** Chapman & Hall. 1993.
133. Eijkelenboom A, Lutzke RA, Boelens R, Plasterk RH, Kaptein R, Hård K.: **The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold.** *Nat Struct Biol* 1995, **2**(9):807-810.
134. El-Khatib Z, Ekström A M, Ledwaba J, Mohapi L, Laher F, Karstaedt K, Charalambous S, Petzold M, Katzenstein K, Lynn M: **Vemia and drug resistance**

- among HIV-1 patients on antiretroviral treatment: a cross-sectional study in Soweto, South Africa.** *AIDS* 2010, **24**:1679-1687.
135. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F.: **Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients.** *Nature* 1990, **345**(6270):84-86.
136. Eshleman S, Hackett JJ, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, Devare SG, Zekeng L, Kaptué L, Marlowe N.: **Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(6):2711-2717.
137. Eshleman S, Crutcher G, Petruskene O, Kunstman K, Cunningham SP, Trevino C, Davis C, Kennedy J, Fairman J, Foley B, Kop J.: **Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(2):813-817.
138. Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D.: **Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors.** *Nat Struct Biol* 1995, **2**:303-308.
139. Esposito F, Corona A, Tramontano E.: **HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions.** *Mol Biol Int* ;: 2012, **2012**:586401.
140. Etard J, Ndiaye I, Thierry-Mieg M, Guèye NF, Guèye PM, Lanièce I, Dieng AB, Diouf A, Laurent C, Mboup S, Sow PS, Delaporte E.: **Mortality and causes of death in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Senegal: a 7-year cohort study.** *AIDS* 2006, **20**(8):1181-1189.
141. Etienne L, and Peeters M.: **Origine du VIH, une réussite émergentielle.** *Virologie* 2010, **14**(3):171-184.
142. Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F, Kimani J, Shi B, Kaul R, Bwayo J, Anzala O, Burger H.: **Recombination following superinfection by HIV-1.** *AIDS* 2004, **18**(2):153-159.
143. Farrington CP: **Interval censored survival data: a generalized linear modelling approach.** *Stat Med* 1996, **15**(3):283-292.
144. Fassati A, and Goff SP.: **Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1.** *J Virol* 2001, **75**(8):3626-3635.
145. Fassati A, Görlich D, Harrison I, Zaytseva L, Mingot JM.: **Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7.** *EMBO J* 2003, **22**(14):3675-3685.
146. Fausther-Bovendo H, Sol-Foulon N, Candotti D, Agut H, Schwartz O, Debré P, Vieillard V.: **HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells.** *AIDS* 2009, **23**(9):1077-1087.
147. Fayet O, Ramond P, Polard P, Prère MF, Chandler M.: **Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences.** *Mol Microbiol* 1990, **4**(10):1771-1777.
148. Felsenstein J: **Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.** *J Mol Evol* 1981, **17**(6):368-376.
149. Ferradini L, Jeannin A, Pinoges L, Izopet J, Odhiambo D, Mankhambo L, Karungi G, Szumilin E, Balandine S, Fedida G, Carrieri MP, Spire B, Ford N, Tassie JM, Guerin PJ, Brasher C.: **Scaling up of highly active antiretroviral therapy in a rural district of Malawi: an effectiveness assessment.** *Lancet* 2006, **367**(9519):1335-1342.

150. Fischer WB: **Vpu from HIV-1 on an atomic scale: experiments and computer simulations.** *FEBS Lett* 2003, **552**(1):39-46.
151. Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, et al.: **The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication.** *Nature* 1986, **320**(6060):367-371.
152. Freed EO, Englund, G and Martin, AM: **Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection.** . *J Virol* 1995, **69**:3949-3954.
153. Freed EO: **HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle.** *Virology* 1998, **251**(1):1-15.
154. Freed EO: **HIV-1 replication.** *Somat Cell Mol Genet* 2001, **26**(1-6):13-33.
155. Freed EO, and Martin MA . **HIV and their replication, p. 1971– 2042.** In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.). *Fields virology, vol 2 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa* 2001.
156. Freed EO: **Viral late domains.** *J Virol* 2002, **76**(10):4679-4687.
157. Friedrich B, Dziuba N, Li G, Endsley MA, Murray JL, Ferguson MR.: **Host factors mediating HIV-1 replication.** *Virus Res* 2011, **161**(2):101-114.
158. Gabuzda D, Lever A, Terwilliger E, Sodroski J.: **Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins.** *J Virol* 1992, **66**(6):3306-3315.
159. Gabuzda D, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, Sodroski J.: **Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes.** *J Virol* 1992, **66**(11):6489-6495.
160. Gale H, Kan VL, Shinol RC.: **Performance of the TruGene human immunodeficiency virus type 1 genotyping kit and OpenGene DNA sequencing system on clinical samples diluted to approximately 100 copies per milliliter.** *Clin Vaccine Immunol* 2006, **13**(2):235-238.
161. Gamble T, Vajdos FF, Yoo S, Worthy lake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP.: **Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid.** *Cell* 1996, **87**(7):1285-1294.
162. Ganser-Pornillos B, Yeager M, Pornillos O.: **Assembly and architecture of HIV.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **726**:441-465.
163. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.: **Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.** *Nature* 1999, **397**:436-440.
164. Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Kim J, Oh MD, Choe K, Salminen M, Robertson DL, Shaw GM, Hahn BH, Peeters M.: **Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001, **17**(8):675-688.
165. Gardner E, Burman WJ, Steiner JF, Anderson PL, Bangsberg DR.: **Antiretroviral medication adherence and the development of class-specific antiretroviral resistance.** *AIDS* 2009, **23**(9):1035-1046.
166. Garnier L, Bowzard JB, Wills JW.: **Recent advances and remaining problems in HIV assembly.** *AIDS* 1998, **12**(Suppl A):S5-16.
167. Garrett N, Xu L, Smit E, Ferns B, El-Gadi S, Anderson, Jane L.: **Raltegravir treatment response in an HIV-2 infected patient : a case report.** *AIDS* 2008, **22**(9):1091-1092.

168. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B.: **Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection.** *Science* 2002, **296**(5577):2354-2360.
169. Gaye A, Gueye-Ndiaye A, Diouf O, Mbengue AS, Touré-kane C, Gaye-Diallo A, Hane AA, Mboup S. : **Prévalence du VIH et facteurs associés**, vol. Chapitre 14. Calverton, USA: MEASURE DHS ICF International; 2012.
170. Gazzard B, Anderson J, Babiker A, Boffito M, Brook G, Brough G, Churchill D, Cromarty B, Das S, Fisher M, Freedman A, Geretti AM, Johnson M, Khoo S, Leen C, Nair D, Peters B, Phillips A, Pillay D, Pozniak A, Walsh J, Wilkins E, Williams I, Williams M, Youle M; BHIVA Treatment Guidelines Writing Group: **British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy 2008.** *HIV Med* 2008, **9**(8):563-608.
171. Geijtenbeek T, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y.: **DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells.** *Cell* 2000, **100**(5):587-597.
172. Geretti AM: **HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management.** *Curr Opin Infect Dis* 2006, **19**(1):1-7.
173. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM.: **Structure-function relationships in HIV-1 Nef.** *EMBO Rep* 2001, **2**(7):580-585.
174. Ghosh R, Ghosh SM, Chawla S.: **Recent advances in antiretroviral drugs.** *Expert Opin Pharmacother* 2011, **12**(1):31-46.
175. Gifford R, Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, Winters M, Shafer RW.: **A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(51):20362-20367.
176. Girard F, Barbault F, Gouyette C, Huynh-Dinh T, Paoletti J, Lancelot G.: **Dimer initiation sequence of HIV-1Lai genomic RNA: NMR solution structure of the extended duplex.** *J Biomol Struct Dyn* 1999, **16**(6):1145-1157.
177. Goethals O, Van Ginderen M, Vos A, Cummings MD, Van Der Borght K, Van Wesenbeeck L, Feyaerts M, Verheyen A, Smits V, Van Loock M, Hertogs K, Schols D, Clayton RF.: **Resistance to raltegravir highlights integrase mutations at codon 148 in conferring cross-resistance to a second-generation HIV-1 integrase inhibitor.** *Antiviral Res* 2011, **91**(2):167-176.
178. Goila-Gaur R, and Strelbel K.: **HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity.** *Retrovirology* 2008, **5**:51.
179. Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, Duarte G, De Souza R, Soto-Ramirez L, Salomón H; NISDI Perinatal Study Group: **Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries.** *AIDS Res Hum Retroviruses Nov;()*: 2006, **22**(11):1186-1191.
180. Göttlinger H, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA.: **Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(8):3195-3199.
181. Gouy M, Guindon S, Gascuel O.: **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Mol Biol Evol* 2010, **27**(2):221-224.
182. Grant R, Kuritzkes DR, Johnson VA, Mellors JW, Sullivan JL, Swanstrom R, D'Aquila RT, Van Gorder M, Holodniy M, Lloyd Jr RM Jr, Reid C, Morgan GF, Winslow DL.: **Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(4):1586-1593.

183. Greenway A, Holloway G, McPhee DA.: **HIV-1 Nef: a critical factor in viral-induced pathogenesis.** *Adv Pharmacol* 2000, **48**:299-343.
184. Greenway A, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, Azad A, Sankovich S, Lambert P: **Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis.** *J Virol* 2002, **76**(6):2692-2702.
185. Grewe B, and Uberla K.: **The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: ménage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle.** *J Gen Virol* 2010, **91**(Pt 8):1893-1897.
186. Groom H, Anderson EC, Dangerfield JA, Lever AM.: **Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs.** *J Gen Virol* 2009, **90**(Pt 5):1141-1147.
187. Gulick R, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H.: **Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 HIV-1 Infection.** *N Engl J Med* 2008, **359**(14):1429-1441.
188. Günthard H, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD.: **Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, **14**(10):869-876.
189. Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, Kleiman L.: **The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA3Lys annealing to viral RNA.** *J Virol* 2007, **81**(20):11322-11331.
190. Guo X, Roldan A, Hu J, Wainberg MA, Liang C.: **Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag.** *J Virol* 2005, **79**(3):1803-1812.
191. Gupta R, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, Lima VD, Günthard HF, Gilks C, Pillay D.: **Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Infect Dis* 2009, **9**(7):409-417.
192. Hales G, Birch C, Crowe S, Workman C, Hoy JF, Law MG, Kelleher AD, Lincoln D, Emery S; CREST investigators.: **A randomised trial comparing genotypic and virtual phenotypic interpretation of HIV drug resistance: the CREST study.** *PLoS Clin Trials* 2006, **1**(3):e18.
193. Hamel DJ, Sankalé J L, Eisen G, Meloni S T, Mullins C, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Kanki P J: **Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, **23**(10):1189-1196.
194. Hammond J, Parikh UM, Koontz DL, Schlueter-Wirtz S, Chu CK, Bazmi HZ, Schinazi RF, Mellors JW.: **In vitro selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 resistant to derivatives of beta-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(9):3930-3932.
195. Hampl H, Sawitzky D, Stöffler-Meilicke M, Groh A, Schmitt M, Eberle J, Gürtler L.: **First case of HIV-1 subtype O infection in Germany.** *Infection* 1995, **23**(6):369-370.
196. Hare S, Vos AM, Clayton RF, Thuring JW, Cummings MD, Cherepanov P.: **Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 **107**(46):20057-20062.

197. Hargittai M, Mangla AT, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K.: **HIV-1 nucleocapsid protein zinc finger structures induce tRNA(Lys,3) structural changes but are not critical for primer/template annealing.** *J Mol Biol* 2001, **312**(5):985-997.
198. Harouse J, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F.: **Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide.** *Science* 1991, **253**(5017):320-323.
199. Harrigan P, Hogg RS, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, Woodward J, Brumme CJ, Brumme ZL, Mo T, Alexander CS, Montaner JS.: **Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naive cohort initiating triple antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2005, **191**(3):339-347.
200. Harrigan P, Wynhoven B, Brumme ZL, Brumme CJ, Sattha B, Major JC, de la Rosa R, Montaner JS.: **HIV-1 drug resistance: degree of underestimation by a cross-sectional versus a longitudinal testing approach.** *J Infect Dis* 2005, **191**(8):1325-1330.
201. Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Kodama E, Mitsuya H, Ohrui H.: **Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1.** *Antivir Chem Chemother* 2004, **15**(4):169-187.
202. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.: **Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004.** *AIDS* 2006, **20**(16):W13-23.
203. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation.: **Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007.** *AIDS* 2011, **25**(5):679-689.
204. Hemelaar J: **The origin and diversity of the HIV-1 pandemic.** *Trends Mol Med* 2012, **18**(3):182-192.
205. Ho D, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.: **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.** *Nature* 1995, **373**(6510):123-126.
206. Hoelscher M, Dowling WE, Sanders-Buell E, Carr JK, Harris ME, Thomschke A, Robb ML, Birx DL, McCutchan FE.: **Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay.** *AIDS* 2002, **16**(15):2055-2064.
207. Hosseinpour MC, van Oosterhout J J, Weigel R, Phiri S, Kamwendo D, Parkin N, Fiscus S A, Nelson J A, Eron J J, Kumwenda J: **The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy.** *AIDS* 2009, **23**(9):1127-1134.
208. Hottiger. M PV, Thimmig RL, McHenry C, Hübscher U.: **Strand displacement activity of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer and its individual subunits.** *J Biol Chem* 1994, **269**(2):986-991.
209. Huang D, Eshleman SH, Brambilla DJ, Palumbo PE, Bremer J W.: **Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(7):3265-3272.
210. Huang M, and Martin MA.: **Incorporation of Pr160(gag-pol) into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein.** *J Virol* 1997, **71**(6):4472-4478.
211. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ.: **Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1**

- subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations.** *J Virol* 2007, **81**(15):7885-7893.
212. Hussain A, Wesley C, Khalid M, Chaudhry A, Jameel S.: **Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation.** *J Virol* 2008, **82**(2):893-902.
213. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W: **HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010, **54**(3):241-247.
214. Iordanskiy S, Berro R, Altieri M, Kashanchi F, Bukrinsky M.: **Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin.** *Retrovirology* 2006, **3**:4.
215. Isel C, Ehresmann C, Marquet R.: **Initiation of HIV Reverse Transcription.** *Viruses* 2010, **2**(1):213-243.
216. Iversen A, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, Merigan TC.: **Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy.** *J Virol* 1996, **70**(2):1086-1090.
217. Jacks T: **Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1990, **157**:93-124.
218. Jacobs G, Loxton AG, Laten A, Robson B, van Rensburg EJ, Engelbrecht S.: **Emergence and diversity of different HIV-1 subtypes in South Africa, 2000-2001.** *J Med Virol* 2009, **81**(11):1852-1859.
219. Janssens W, Buvé A, Nkengasong JN.: **The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa.** *AIDS* 1997, **11**(6):705-712.
220. Japour A, Mayers DL, Johnson VA, Kuritzkes DR, Beckett LA, Arduino JM, Lane J, Black RJ, Reichelderfer PS, D'Aquila RT, et al.: **Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group.** *Antimicrob Agents Chemother* 1993, **37**(5):1095-1101.
221. Jaskolski M, Alexandratos JN, Bujacz G, Wlodawer A.: **Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy.** *FEBS J* 2009, **276**(11):2926-2946.
222. Jennes W, Kyongo JK, Vanhommerig E, Camara M, Coppens S, Seydi M, Mboup S, Heyndrickx L, Kestens L.: **Molecular epidemiology of HIV-1 transmission in a cohort of HIV-1 concordant heterosexual couples from Dakar, Senegal.** *PLoS One* 2012, **7**(5):e37402.
223. Jiao Y, Song Y, Kou B, Wang R, Liu Z, Huang X, Chen D, Zhang T, Wu H.: **Primary CXCR4 Co-receptor Use in Acute HIV Infection Leads to Rapid Disease Progression in the AE Subtype.** *Viral Immunol* 2012, **25**(4):262-267.
224. Jochmans D, Vingerhoets J, Arnoult E, Geeraert L, Guillemont J.: **Human immunodeficiency virus type 1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.** In: *Antiviral Research: Strategies in Antiviral Drug Discovery.* edn. Edited by LaFemina RL. Washington: ASM Press; 2009: pp. 33-50.
225. Johnson J, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, Smith A, Bennett DE, Monsour M, Sandstrom P, Lanier ER, Heneine W.: **Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy.** *PLoS Med* 2008, **5**(7):e158.

226. Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, Samri A, Autran B, Goh LE, Perrin L.: **A patient with HIV-1 superinfection.** *N Engl J Med* 2002, **347**(10):731-736.
227. 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* 2012, **7**(3):e33579.
228. Kagan R, Johnson EP, Siaw M, Biswas P, Chapman DS, Su Z, Platt JL, Pesano RL.: **A genotypic test for HIV-1 tropism combining Sanger sequencing with ultradeep sequencing predicts virologic response in treatment-experienced patients.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e46334.
229. Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, Nakiyingi J, Rutebemberwa A, Morgan D, Weber J, Gilks C, Whitworth J.: **Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda.** *J Infect Dis* 2002, **185**(9):1244-1250.
230. Kameoka M, Morgan M, Binette M, Russell RS, Rong L, Guo X, Mouland A, Kleiman L, Liang C, Wainberg MA.: **The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription.** *J Virol* 2002, **76**(8):3637-3645.
231. Kantor R, Machekano R, Gonzales MJ, Dupnik K, Schapiro JM, Shafer RW.: **Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database: an expanded data model integrating natural language text and sequence analysis programs.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(1):296-299.
232. Kantor R, Shafer R W, Follansbee S, Taylor J, Shilane D, Hurley L, Nguyen D P, Katzenstein D, Fessel W J: **Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy.** *AIDS* 2004, **18**(11):1503-1511.
233. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Snoeck J, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Holguin A, Ariyoshi K, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brígido LF, Grossman Z, Morris L, Vandamme AM, Tanuri A, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW: **Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration.** *PLoS Med* 2005, **2**(4):e112.
234. Kantor R: **Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications.** *Curr Opin Infect Dis* 2006, **19**(6):594-606.
235. Karim Q, Kharsany AB, Frohlich JA, Baxter C, Yende N, Mansoor LE, Mlisana KP, Maarschalk S, Arulappan N, Grobler A, Sibeko S, Omar Z, Gengiah TN, Mlotshwa M, Samsunder N, Karim SS.: **Recruitment of high risk women for HIV prevention trials: baseline HIV prevalence and sexual behavior in the CAPRISA 004 tenofovir gel trial.** *Trials* 2011, **12**:67.
236. Kassu A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M, Ota F, Sugiura W.: **Molecular epidemiology of HIV type 1 in treatment-naive patients in north Ethiopia.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, **23**(4):564-568.
237. Katlama C, Clotet B, Plettenberg A, Jost J, Arasteh K, Bernasconi E, Jeantils V, Cutrell A, Stone C, Ait-Khaled M, Purdon S: **The role of abacavir (ABC, 1592) in antiretroviral therapy-experienced patients: results from a randomized, double-blind, trial. CNA3002 European Study Team.** *AIDS* 2000, **14**(7):781-789.
238. Keele B, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte

- E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH.: **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.** *Science* 2006, **313**(5786):523-526.
239. Keiser O, Tweya H, Boulle A, Braitstein P, Schechter M, Brinkhof MW, Dabis F, Tuboi S, Sprinz E, Pujades-Rodriguez M, Calmy A, Kumarasamy N, Nash D, Jahn A, MacPhail P, Lüthy R, Wood R, Egger M, ART-LINC of IeDEA Study Group.: **Switching to second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: comparison of programmes with and without viral load monitoring.** *AIDS* 2009, **23**(14):1867-1874.
240. Keiser O, Chi BH, Gsponer T, Boulle A, Orrell C, Phiri S, Maxwell N, Maskew M, Prozesky H, Fox MP, Westfall A, Egger M; IeDEA Southern Africa Collaboration.: **Outcomes of antiretroviral treatment in programmes with and without routine viral load monitoring in Southern Africa.** *AIDS* 2011, **25**(14):1761-1769.
241. Kellam P, and Larder BA.: **Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates.** *Antimicrob Agents Chemother* 1994, **38**(1):23-30.
242. Kempf D, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, McDonald E, Kukulka MJ, Hsu A, Granneman GR, Baroldi PA, Sun E, Pizzuti D, Plattner JJ, Norbeck DW, Leonard JM.: **Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**(3):654-660.
243. Kestler Hr, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC.: **Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS.** *Cell* 1991, **65**(4):651-662.
244. Kijak G, McCutchan FE.: **HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination.** *Curr Infect Dis Rep* 2005, **7**(6):480-488.
245. King M, Brun SC, Kempf DJ.: **Relationship between adherence and the development of resistance in antiretroviral-naïve, HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir or nelfinavir.** *J Infect Dis* 2005, **191**(12):2046-2052.
246. Kita K, Ndembí N, Ekwalanga M, Ido E, Kazadi R, Bikandou B, Takehisa J, Takemura T, Kageyama S, Tanaka J, Parra HJ, Hayami M, Ichimura H: **Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**(12):1352-1357.
247. Kiwelu I, Novitsky V, Margolin L, Baca J, Manongi R, Sam N, Shao J, McLane MF, Kapiga SH, Essex M.: **HIV-1 Subtypes and Recombinants in Northern Tanzania: Distribution of Viral Quasispecies.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e47605.
248. Kleiman L: **tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1.** *IUBMB Life* 2002, **53**(2):107-114.
249. Kleiman L, Halwani R, Javanbakht H.: **The selective packaging and annealing of primer tRNALys3 in HIV-1.** *Curr HIV Res* 2004, **2**(2):163-175.
250. Klein J, and Moeschberger M.: **Survival analysis.** New York: Springer; 2003.
251. Kohlstaedt L, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA.: **Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor.** *Science* 1992, **256**(5065):1783-1790.
252. Kolchinsky P, Kiprilov E, Bartley P, Rubinstein R, Sodroski J.: **Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops.** *J Virol* 2001, **75**(7):3435-3443.

253. Kosakovsky Pond SaSD: **Are All Subtypes Created Equal? The Effectiveness of Antiretroviral Therapy against Non-Subtype B HIV-1.** *Clin Infect Dis* 2009, **48**(9):1306-1309.
254. Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeois A, Koulla-Shiro S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M, Delaporte E: **Low levels of antiretroviral-resistant HIV infection in a routine clinic in Cameroon that uses the World Health Organization (WHO) public health approach to monitor antiretroviral treatment and adequacy with the WHO recommendation for second-line treatment.** *Clin Infect Dis* 2009, **48**(9):1318-1322.
255. Koval C, Dykes C, Wang J, Demeter LM.: **Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1: correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N + L100I by the nucleoside resistance mutation L74V.** *Virology* 2006, **353**(1):184-192.
256. Kräusslich H: **Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(8):3213-3217.
257. Kräusslich H, and Welker R.: **Intracellular transport of retroviral capsid components.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;,**214**:25-63.
258. Krishnan L, and Engelman A.: **Retroviral Integrase Proteins and HIV-1 DNA Integration.** *J Biol Chem* 2012, [Epub ahead of print].
259. Kuritzkes DR: **Drug resistance in HIV-1.** *Current Opinion in Virology* 2011, **1**:582-589.
260. Kwong P, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.: **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** *Nature* 1998, **393**(6686):648-659.
261. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C.: **Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development.** *Indian J Med Res* 2005, **121**(4):287-314.
262. Lalezari J, Bellos NC, Sathasivam K, Richmond GJ, Cohen CJ, Myers RA Jr, Henry DH, Raskino C, Melby T, Murchison H, Zhang Y, Spence R, Greenberg ML, Demasi RA, Miralles GD; T1249-102 Study Group.: **T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen.** *J Infect Dis* 2005, **191**(7):1155-1163.
263. Land A, Braakman I.: **Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum.** *Biochimie* 2001, **83**(8):783-790.
264. Landi A, Iannucci V, Nuffel AV, Meuwissen P, Verhasselt B.: **One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef.** *Curr HIV Res* 2011, **9**(7):496-504.
265. Landman R, Canestri A, Thiam S.: **First evaluation of d4T, ddI and EFZ in antiretroviral naive patients in Senegal : ANRS 1206/IMEA 012 study.** In: *XIIth international conference on Aids and STDs in Africa.* Ouagadougou; 2001.
266. Landman R, Schiemann R, Thiam S, Vray M, Canestri A, Mboup S, Kane CT, Delaporte E, Sow PS, Faye MA, Gueye M, Peytavin G, Dalban C, Girard PM, Ndoye I; Imea 011/ANRS 12-04 Study Group.: **Once-a-day highly active antiretroviral therapy in treatment-naive HIV-1-infected adults in Senegal.** *AIDS* 2003, **17**(7):1017-1022.
267. Landman R, Poupart M, Diallo M, Ngom Gueye NF, Diakhate N, Ndiaye B, Toure Kane C, Trylesinski A, Diop H, Mboup S, Koita Fall MB, Delaporte E, Benalycherif A, Girard PM, Sow PS: **Tenofovir-emtricitabine-efavirenz in HIV-I-infected adults**

- in Senegal: a 96-week pilot trial in treatment-naïve patients.** *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2009, **8**(6):379-384.
268. Lansdon E, Liu Q, Leavitt SA, Balakrishnan M, Perry JK, Lancaster-Moyer C, Kutty N, Liu X, Squires NH, Watkins WJ, Kirschberg TA.: **Structural and binding analysis of pyrimidinol carboxylic acid and N-hydroxy quinazolinidine HIV-1 RNase H inhibitors.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(6):2905-2915.
269. Lapadat-Tapolsky M, Pernelle C, Borie C, Darlix JL.: **Analysis of the nucleic acid annealing activities of nucleocapsid protein from HIV-1.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**(13):2434-2441.
270. Larder BA, Kemp S D, Harrigan P R: **Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy.** *Science* 1995, **269**(5224):696-699.
271. Laurent C, Diakhate N, Gueye N F, Touré M A, Sow P S, Faye M A, Gueye M, Lanièce I, Touré Kane C, Liégeois F, Vergne L, Mboup S, Badiane S, Ndoye I, Delaporte E: **The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study.** *AIDS* 2002, **16**(10):1363-1370.
272. Laurent C, Ngom Gueye N F, Ndour C T, Gueye P M, Diouf M, Diakhate N, Touré Kane N C, Lanièce I, Ndir A, Vergne L, Ndoye I, Mboup S, Sow P S, Delaporte E: **Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults; ANRS 1215/1290 Study Group.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **38**(1):14-17.
273. Laurent C, Kouanfack C, Koulla-Shiro S, Njoume M, Nkene YM, Ciaffi L, Brulet C, Peytavin G, Vergne L, Calmy A, Mpoudi-Ngolé E, Delaporte E.: **Long-term safety, effectiveness and quality of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine and lamivudine.** *AIDS* 2007, **21**(6):768-771.
274. Laurent C, Kouanfack C, Laborde-Balen G, Aghokeng AF, Mbouga JB, Boyer S, Carrieri MP, Mben JM, Dotsop M, Kazé S, Molinari N, Bourgeois A, Mpoudi-Ngolé E, Spire B, Koulla-Shiro S, Delaporte E; Stratall ANRS 12110/ESTHER study group.: **Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial.** *Lancet Infect Dis* 2011, **11**(11):825-833.
275. Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, Benichou S.: **Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1.** *J Biol Chem* 2002, **277**(47):45091-45098.
276. Le Rouzic E, and Benichou S.: **The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle.** *Retrovirology* 2005, **2**:11.
277. Ledergerber B, Egger M, Opravil M, Telenti A, Hirscher B, Battegay M, Vernazza P, Sudre P, Flepp M, Furrer H, Francioli P, Weber R.: **Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study.** *Lancet* 1999, **353**(9156):863-868.
278. Lee MS, and Craigie R.: **A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(4):1528-1533.
279. Lee S, Ko CY, Wang CT, Chen SS.: **Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability.** *J Biol Chem* 2002, **277**(18):15363-15375.
280. Lee S, Potempa M, Swanstrom R.: **The Choreography of HIV-1 Proteolytic Processing and Virion Assembly.** *J Biol Chem* 2012, [Epub ahead of print].

281. Leigh BA, Holmes EC: **Evolutionary biology of human immunodeficiency virus.** *Ann Rev Ecol Syst* 1994, **25**:127-162.
282. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM.: **Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(11):6588-6592.
283. Lengruber R, Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Baumann J, Santos AF, Pathak VK, Soares MA.: **Phenotypic characterization of drug resistance-associated mutations in HIV-1 RT connection and RNase H domains and their correlation with thymidine analogue mutations.** *J Antimicrob Chemother* 2011, **66**(4):702-708.
284. Leonard C, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ.: **Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.** *J Biol Chem* 1990, **265**(18):10373-10382.
285. Leoz M, Chaix ML, Delaugerre C, Rivoisy C, Meyer L, Rouzioux C, Simon F, Plantier JC.: **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* 2011, **25**(11):1371-1377.
286. Levin A, Rosenbluh J, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A.: **Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins.** *Mol Med* 2010, **16**(1-2):34-44.
287. Levy JA: **Is HIV superinfection worrisome?** *Lancet* 2003, **361**(9352):98-99.
288. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY.: **Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions.** *Cell Res* 2005, **15**(11-12):923-934.
289. Li L, Chen L, Yang S, Liu Y, Li H, Bao Z, Wang Z, Zhuang D, Liu S, Li J: **Near full-length genomic characterization of a novel HIV type 1 subtype B/C recombinant strain from Yunnan, China.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010, **26**(6):711-716.
290. Li W, Tanimura M, Sharp PM.: **Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences.** *Mol Biol Evol* 1988, **5**(4):313-330.
291. Li Y, Kar AK, Sodroski J.: **Target cell type-dependent modulation of human immunodeficiency virus type 1 capsid disassembly by cyclophilin A.** *J Virol* 2009, **83**(21):10951-10962.
292. Liang C, and Wainberg MA. : **The Role of Tat in HIV-1 Replication: an Activator and/or a Suppressor?** *AIDS Rev* 2002, **4**:41-49.
293. Linka M, Brücková M, Malý M, Vandasová J, Stanková M, Reinis M.: **A study of HIV-1 genetic diversity in the Czech Republic: 1986-2007.** *Cent Eur J Public Health* 2008, **16**(4):175-177.
294. Little RJA, and Rubin DB.: **Statistical analysis with missing data:** Wiley. 2002.
295. Llano M, Delgado S, Vanegas M, Poeschla EM.: **Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase.** *J Biol Chem* 2004, **279**(53):55570-55577.
296. Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcântara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, Rodrigues R, Grisard EC, Pinto AR.: **Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil.** *J Med Virol* 2007, **79**(10):1455-1463.
297. Long L, Fox M, Sanne I, Rosen S: **The high cost of second-line antiretroviral therapy for HIV/AIDS in South Africa.** *AIDS* 2010, **24**(6):915-919.
298. Louie B, Wong E, Klausner JD, Liska S, Hecht F, Dowling T, Obeso M, Phillips SS, Pandori MW.: **Assessment of rapid tests for detection of human immunodeficiency**

- virus-specific antibodies in recently infected individuals. *J Clin Microbiol* 2008, **46**(4):1494-1497.
299. Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP.: **Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B.** *Cell* 1993, **73**(6):1067-1078.
300. Lue J, Hsu M, Yang D, Marx P, Chen Z, Cheng-Mayer C.: **Addition of a single gp120 glycan confers increased binding to dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin and neutralization escape to human immunodeficiency virus type 1.** *J Virol* 2002, **76**(20):10299-10306.
301. Madrid R, Janvier K, Hitchin D, Day J, Coleman S, Noviello C, Bouchet J, Benmerah A, Guatelli J, Benichou S.: **Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity.** *J Biol Chem* 2005, **280**(6):5032-5044.
302. Madruga J, Cahn P, Grinsztejn B, Haubrich R, Lalezari J, Mills A, Pialoux G, Wilkin T, Peeters M, Vingerhoets J, de Smedt G, Leopold L, Trefiglio R, Woodfall B; DUET-1 study group.: **Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet* 2007 **370**(9581):29-38.
303. Maes B, Schrooten Y, Snoeck J, Derdelinckx I, Van Ranst M, Vandamme AM, Van Laethem K.: **Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory.** *J Virol Methods* 2004, **119**(1):45-49.
304. Maïga A, Descamps D, Morand-Joubert L, Malet I, Derache A, Cisse M, Koita V, Akonde A, Diarra B, Wirden M, Tounkara A, Verlinden Y, Katlama C, Costagliola D, Masquelier B, Calvez V, Marcelin AG: **Resistance-associated mutations to etravirine (TMC-125) in antiretroviral-naïve patients infected with non-B HIV-1 subtypes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(2):728-733.
305. Malim M, Böhnlein S, Hauber J, Cullen BR.: **Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function.** *Cell* 1989, **58**(1):205-214.
306. Malim M, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR.: **The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA.** *Nature* 1989, **338**(6212):254-257.
307. Mamadou S, Vidal N, Montavon C, Ben A, Djibo A, Rabiou S, Soga G, Delaporte E, Mboup S, Peeters M.: **Emergence of complex and diverse CRF02-AG/CRF06-cpx recombinant HIV type 1 strains in Niger, West Africa.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003, **19**(1):77-82.
308. Manrique M, González SA, Affranchino JL.: **Functional relationship between the matrix proteins of feline and simian immunodeficiency viruses.** *Virology* 2004, **329**(1):157-167.
309. Mansky LMaTH: **Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.** *J Virol* 1995, **69**(8):5087-5094.
310. Marcelin A, Flandre P, Descamps D, Morand-Joubert L, Charpentier C, Izopet J, Trabaud MA, Saoudin H, Delaugerre C, Tamalet C, Cottalorda J, Bouvier-Alias M, Bettinger D, Dos Santos G, Ruffault A, Alloui C, Henquell C, Rogez S, Barin F, Signori-Schmuck A, Vallet S, Masquelier B, Calvez V; ANRS AC11 Resistance Study Group.: **Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected patients.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(1):72-77.

311. Marconi VC, Sunpath H, Lu Z, Gordon M, Koranteng-Apeagyei K, Hampton J, Carpenter S, Giddy J, Ross D, Holst H, Losina E, Walker B D, Kuritzkes D R: **Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. South Africa Resistance Cohort Study Team.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**:1589-1597.
312. Maréchal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O.: **Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis.** *J Virol* 2001, **75**(22):11166-11177.
313. Margottin F, Benichou S, Durand H, Richard V, Liu LX, Gomas E, Benarous R.: **Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation.** *Virology* 1996, **223**(2):381-386.
314. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strelbel K, Benarous R.: **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* 1998, **1**(4):565-574.
315. Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al.: **Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1.** *Science* 1994, **265**(5178):1587-1590.
316. Marshall NF, and Price DH.: **Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**(5):2078-2090.
317. Martinez-Cajas JaWM: **Protease inhibitor resistance in HIV-infected patients: molecular and clinical perspectives.** *Antiviral Res* 2007, **76**(3):203-221.
318. Maslin J, Rogier C, Berger F, Khamil MA, Mattera D, Grandadam M, Caron M, Nicand E.: **Epidemiology and genetic characterization of HIV-1 isolates in the general population of Djibouti (Horn of Africa).** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **39**(2):129-132.
319. Mauclère P, Damond F, Apetrei C, Loussert-Ajaka I, Souquière S, Buzelay L, Dalbon P, Jolivet M, Mony Lobe M, Brun-Vézinet F, Simon F, Barin F.: **Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997, **13**(12):987-993.
320. Maurer B, Bannert H, Darai G, Flügel RM.: **Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus.** *J Virol* 1988 **62**(5):1590-1597.
321. McCutchan F, Artenstein AW, Sanders-Buell E, Salminen MO, Carr JK, Mascola JR, Yu XF, Nelson KE, Khamboonruang C, Schmitt D, Kieny MP, McNeil JG, Burke DS: **Diversity of the envelope glycoprotein among human immunodeficiency virus type 1 isolates of clade E from Asia and Africa.** *J Virol* 1996, **70**(6):3331-3338.
322. McCutchan FE: **Understanding the genetic diversity of HIV-1.** *AIDS* 2000, **14**(Suppl 3):S31-44.
323. McNicholas P, Wei Y, Whitcomb J, Greaves W, Black TA, Tremblay CL, Strizki JM.: **Characterization of emergent HIV resistance in treatment-naïve subjects enrolled in a vicriviroc phase 2 trial.** *J Infect Dis* 2010, **201**(10):1470-1480.
324. Mehellou Y, De Clercq E.: **Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go.** *J Med Chem* 2010, **53**(2):521-538.
325. Meloni S, Kim B, Sankalé JL, Hamel DJ, Tovanabutra S, Mboup S, McCutchan FE, Kanki PJ.: **Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3.** *J Virol* 2004, **78**(22):12438-12445.

326. Meloni S, Sankalé JL, Hamel DJ, Eisen G, Guéye-Ndiaye A, Mboup S, Kanki PJ.: **Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A3 in Senegal from 1988 to 2001.** *J Virol* 2004, **78**(22):12455-12461.
327. Menéndez-Arias L: **Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance.** *Trends Pharmacol Sci* 2002, **23**(8):381-388.
328. Menéndez-Arias L: **Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase.** *Virus Res* 2008, **134**(1-2):124-146.
329. Mercier S, Gueye NF, Cournil A, Fontbonne A, Copin N, Ndiaye I, Dupuy AM, Cames C, Sow PS, Ndoye I, Delaporte E, Simondon KB.: **Lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-1-infected adults on 4- to 9-year antiretroviral therapy in Senegal: a case-control study.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, **51**(2):224-230.
330. Metzner K, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zöllner B, Jessen H, Schewe K, Fenske S, Gellermann H, Stellbrink HJ.: **Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters.** *AIDS* 2005, **19**(16):1819-1825.
331. Meusser B, and Sommer T.: **Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation.** *Mol Cell* 2004, **14**(2):247-258.
332. Meuwissen P, Stolp B, Iannucci V, Vermeire J, Naessens E, Saksela K, Geyer M, Vanham G, Arien KK, Fackler OT, Verhasselt B.: **Identification of a highly conserved valine-glycine-phenylalanine amino acid triplet required for HIV-1 Nef function.** *Retrovirology* 2012, **9**:34.
333. Mewshaw J, Myrick FT, Wakefield DA, Hooper BJ, Harris JL, McCready B, Borroto-Esoda K.: **Dioxolane guanosine, the active form of the prodrug diaminopurine dioxolane, is a potent inhibitor of drug-resistant HIV-1 isolates from patients for whom standard nucleoside therapy fails.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, **29**(1):11-20.
334. Miller M, Jaskolski, M., Rao, Mohana J. K., Leis, J. and Wlodawer, A.: **Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family.** *Nature* 1989, **337**:576-579.
335. Miller MD, Farnet, C. M. and Bushman, F. D.: **Human immunode®ciency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition.** *J Virol* 1997, **71**:5382-5390.
336. Misumi S, Inoue M, Dochii T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S.: **Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1.** *J Biol Chem* 2010, **285**(33):25185-25195.
337. Mitchell R, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC: **Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking.** *PLoS Pathog* 2009, **5**(5):e1000450.
338. Miyamoto F, and Kodama EN.: **Novel HIV-1 fusion inhibition peptides: designing the next generation of drugs.** *Antivir Chem Chemother* 2012, **22**(4):151-158.
339. Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB.: **HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes.** *Cell* 2009, **137**(3):433-444.
340. Mocroft A, Ruiz L, Reiss P, Ledergerber B, Katlama C, Lazzarin A, Goebel FD, Phillips AN, Clotet B, Lundgren JD; EuroSIDA study group.: **Virological rebound after suppression on highly active antiretroviral therapy.** *AIDS* 2003, **17**(12):1741-1751.
341. Montagnier L: **Les rétrovirus.** *Flammarion Medecine Science, France* 1989:81-89.

342. Montano M, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M.: **Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes.** *J Virol* 1997, **71**(11):8657-8665.
343. Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, Perret JL, Boumah A, Saman E, Mboup S, Delaporte E, Peeters M.: **Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000, **23**(5):363-374.
344. Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK.: **The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**(1):54-84.
345. Moore JP: **Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy.** *Science* 1997, **276**(5309).
346. Moore JP, and Doms RW.: **The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(19):10598-10602.
347. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP.: **NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR.** *J Mol Biol* 2003, **327**(1):215-227.
348. Mouscadet J, Tchertanov L, Deprez E.: **Structures et rôles de l'intégrase du VIH dans le cycle viral.** *Virologie* 2007, **11**:S143-152.
349. Mracna M, Becker-Pergola G, Dileanis J, Guay LA, Cunningham S, Jackson JB, Eshleman SH.: **Performance of Applied Biosystems ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of non-subtype B human immunodeficiency virus type 1 from Uganda.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(12):4323-4327.
350. Mulky A, Sarafianos SG, Arnold E, Wu X, Kappes JC.: **Subunit-specific analysis of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in vivo.** *J Virol* 2004, **78**(13):7089-7096.
351. Murakami T, Ablan, S., Nagashima, K., Komano, J., Miyauchi, K., Matsuda, Z., Freed, E., Yamamoto, N.: **Characterization of HIV-1 matrix mutants: effect on the early stage of infection.** Meeting Retroviruses, Cold Spring Harbor, New York, May 24–29.; 2005.
352. Murakami T: **Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions.** *Mol Biol Int* 2012, **2012**(682850).
353. Muthumani K, Hwang DS, Desai BM, Zhang D, Dayes N, Green DR, Weiner DB.: **HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**(40):37820-37831.
354. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M.: **Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions.** *J Virol* 2005, **79**(2):764-770.
355. Nasioulas G, Paraskevis D, Magiorkinis E, Theodoridou M, Hatzakis A.: **Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: evidence of A/G/I recombination.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999, **15**(8):745-758.
356. Nathalie A, and Charneau P.: **Devenir du génome VIH-1 : du transport intracellulaire jusqu'à l'intégration.** *Virologie* 2009, **13**(n° spécial):S5-S13.
357. Ndiaye H, Toure-Kane C, Vidal N, Niama FR, Niang-Diallo PA, Dièye T, Gaye-Diallo A, Wade AS, Peeters M, Mboup S: **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* 2009, **52**(2):249-252.
358. Ndung'u T, and Weiss RA.: **On HIV diversity.** *AIDS* 2012, **26**(10):1255-1260.

359. Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, Bass IN, Moudindo J, Mebenga A, Esteban A, Van Heuverswyn F, Liegeois F, Kranzusch PJ, Walsh PD, Sanz CM, Morgan DB, Ndjango JB, Plantier JC, Locatelli S, Gonder MK, Leendertz FH, Boesch C, Todd A, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Hahn BH, Peeters M.: **Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas.** *J Virol* 2010, **84**(3):1464-1476.
360. Neogi U: **The expanding HIV-1 epidemic aggravates therapeutics and vaccine development programs in India.** *Bioinformation* 2009, **4**(3):90-91.
361. Nisole S, and Saïb A.: **Early steps of retrovirus replicative cycle.** *Retrovirology* 2004, **2004**(1-9).
362. Nkengasong J, Willems B, Janssens W, Cheingsong-Popov R, Heyndrickx L, Barin F, Ondo P, Fransen K, Goudsmit J, van der Groen G.: **Lack of correlation between V3-loop peptide enzyme immunoassay serologic subtyping and genetic sequencing.** *AIDS* 1998, **12**(12):1405-1412.
363. Nomaguchi M, Doi N, Matsumoto Y, Sakai Y, Fujiwara S, Adachi A.: **Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins.** *Front Microbiol* 2012, **3**:267.
364. Ono A: **HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization.** *Future Virol* 2009, **4**(3):241-257.
365. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD.: **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.** *N Engl J Med* 1998, **338**(13):853-860.
366. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, Rock D, Falloon J, Davey RT Jr, Dewar RL, Metcalf JA, Hammer S, Mellors JW, Coffin JM.: **Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(1):406-413.
367. Pancera P: **Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1.** *Virologie* 2005, **9**:457-472.
368. Parada CA, and Roeder RG.: **Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain.** *Nature* 1996, **384**(6607):375-378.
369. Paraskevis D, Magiorkinis M, Vandamme AM, Kostrikis LG, Hatzakis A.: **Re-analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated 'subtype I', reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 3):575-580.
370. Paredes R, Mocroft A, Kirk O, Lazzarin A, Barton SE, van Lunzen J, Katzenstein TL, Antunes F, Lundgren JD, Clotet B.: **Predictors of virological success and ensuing failure in HIV-positive patients starting highly active antiretroviral therapy in Europe: results from the EuroSIDA study.** *Arch Intern Med* 2000, **160**(8):1123-1132.
371. Peeters M, Aghokeng A F, Delaporte E: **Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays.** *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**(10):1525-1531.
372. Peeters M, Chaix ML, Delaporte E.: **La diversité génétique du VIH-1.** *Virologie* 2000, **4**(5):371-381.
373. Peeters M, Chaix ML, Delaporte E.: **Phylogénie des SIV et des VIH : Mieux comprendre l'origine des VIH.** *Med Sci* 2008, **24**(6-7):621-628.

374. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden Haesevelde M, Delaporte E.: **Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa.** *AIDS* 1997, **11**(4):493-498.
375. Peeters M, Lobe V, Nkengasong J, Willems B, Delforge ML, Van Renterghem L, Revets H, Sprecher S, van der Groen G.: **HIV-1 group O infection in Belgium.** *Acta Clin Belg* 1995, **50**(3):171-173.
376. Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN.: **Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials.** *AIDS* 2003, **17**(18):2547-2560.
377. Pére H, Charpentier C, Mbelesso P, Dandy M, Matta M, Moussa S, De Dieu Longo J, Grésenguet G, Abraham B, Bélec L: **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* 2012, **28**(4):315-323.
378. Perkins N, Edwards NL., Duckett C.S., Agranoff AB., Schmid RM., Nabel GJ.: **A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation.** *EMBO J* 1993, **12**(9):3551-3558.
379. Pettit S, Michael SF and Swanstrom R.: **The specificity of the HIV-1 protease.** *Perspect Drug Discov Des* 1993, **1**:69-83.
380. Phillips A, Pillay D, Miners AH, Bennett DE, Gilks CF, Lundgren JD.: **Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model.** *Lancet* 2008, **371**(9622):1443-1451.
381. Pierson TC, and Doms RW.: **HIV-1 entry and its inhibition.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2003, **281**:1-27.
382. Piguet V, and Sattentau Q.: **Dangerous liaisons at the virological synapse.** *J Clin Invest* 2004, **114**(5):605-610.
383. Pillay D, Green H, Matthias R, Dunn D, Phillips A, Sabin C, Evans B; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance.: **Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom.** *J Infect Dis* 2005, **192**(6):967-973.
384. Piller S, Dubay JW, Derdeyn CA, Hunter E.: **Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity.** *J Virol* 2000, **74**(24):11717-11723.
385. Plantier J, Damond F, Lasky M, Sankalé JL, Apetrei C, Peeters M, Buzelay L, M'Boup S, Kanki P, Delaporte E, Simon F, Barin F.: **V3 serotyping of HIV-1 infection: correlation with genotyping and limitations.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999, **20**(5):432-441.
386. Plantier JCL, M. Dickerson, J. E. De Oliveira, F. Cordonnier, F. Lemee, V. Damond, F. Robertson, D. L. Simon, F.: **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** *Nature medicine* 2009, **15**(8):871-872.
387. Pond S, Ridgeway WK, Robertson R, Wang J, Millar DP.: **HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(5):1404-1408.
388. Prado J, Franco S, Matamoros T, Ruiz L, Clotet B, Menéndez-Arias L, Martínez MA, Martinez-Picado J.: **Relative replication fitness of multi-nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains bearing a dipeptide insertion in the fingers subdomain of the reverse transcriptase and mutations at codons 67 and 215.** *Virology* 2004, **326**(1):103-112.

389. Price M, Wallis CL, Lakhi S, Karita E, Kamali A, Anzala O, Sanders EJ, Bekker LG, Twesigye R, Hunter E, Kaleebu P, Kayitenkore K, Allen S, Ruzagira E, Mwangome M, Mutua G, Amornkul PN, Stevens G, Pond SL, Schaefer M, Papathanasopoulos MA, Stevens W, Gilmour J; IAVI Early Infection Cohort Study Group.: **Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011, **27**(1):5-12.
390. R DCT: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** 2009.
391. Ramirez B, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M.: **Implications of recombination for HIV diversit.** *Virus Res* 2008, **134**(1-2):64-73.
392. Ramos A, Hu DJ, Nguyen L, Phan KO, Vanichseni S, Promadej N, Choopanya K, Callahan M, Young NL, McNicholl J, Mastro TD, Folks TM, Subbarao S.: **Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users.** *J Virol* 2002, **76**(15):7444-7452.
393. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD.: **The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy.** *Nat Med* 2000, **6**(1):82-85.
394. Ranki A, Lagerstedt A, Ovod V, Aavik E, Krohn KJ.: **Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines.** *Arch Virol* 1994, **139**(3-4):365-378.
395. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M.: **Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes.** *J Hum Virol* 2001, **4**(1):16-25.
396. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premrri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; MOPH-TAVEG Investigators: **Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.** *N Engl J Med* 2009, **361**(23):2209-2220.
397. Rhee S, Liu T, Ravela J, Gonzales MJ, Shafer RW.: **Distribution of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase mutation patterns in 4,183 persons undergoing genotypic resistance testing.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(8):3122-3126.
398. Richman D, Morton SC, Wrin T, Hellmann N, Berry S, Shapiro MF, Bozzette SA.: **The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States.** *AIDS* 2004, **18**(10):1393-1401.
399. Rimsky L, Vingerhoets J, Van Eygen V, Eron J, Clotet B, Hoogstoel A, Boven K, Picchio G.: **Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012, **59**(1):39-46.
400. Roberts J, Bebenek K, Kunkel TA.: **The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.** *Science* 1988, **242**(4882):1171-1173.
401. Rodés B, Sheldon J, Toro C, Cuevas L, Pérez-Pastrana E, Herrera I, Soriano V.: **Quantitative detection of plasma human immunodeficiency virus type 2 subtype A RNA by the Nuclisens EasyQ Assay (version 1.1).** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(1):88-92.

402. Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH.: **Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1.** *J Gen Virol* 2010, **91**(Pt 1):1-12.
403. Romano L, Venturi G, Bloor S, Harrigan R, Larder B A., Major J C, Zazzi M: **Broad nucleoside-analogue resistance implications for human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase mutations at codons 44 and 118.** *J Infect Dis* 2002, **185**(7):898-904.
404. Roques P, Robertson DL, Souquière S, Apetrei C, Nerrienet E, Barré-Sinoussi F, Müller-Trutwin M, Simon F.: **Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N.** *AIDS* 2004, **18**(10):1371-1381.
405. Rosenbluh J, Hayouka Z, Loya S, Levin A, Armon-Omer A, Britan E, Hizi A, Kotler M, Friedler A, Loyter A.: **Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides.** *J Biol Chem* 2007, **282**(21):15743-15753.
406. Rossenkhant R, Novitsky V, Sebunya TK, Musonda R, Gashe BA, Essex M.: **Viral diversity and diversification of major non-structural genes vif, vpr, vpu, tat exon 1 and rev exon 1 during primary HIV-1 subtype C infection.** *PLoS One* 2012, **7**(5):e35491.
407. Rouet F, Foulongne V, Viljoen J, Steegen K, Becquart P, Valéa D, Danaviah S, Segondy M, Verhofstede C, Van de Perre P; WHO/ANRS 1289 Kesho Bora Study Group.: **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* 2010, **163**(2):253-257.
408. Ruffin N, Borggren M, Euler Z, Fiorino F, Grupping K, Hallengård D, Javed A, Mendonca K, Pollard C, Reinhart D, Saba E, Sheik-Khalil E, Sköld A, Ziglio S, Scarlatti G, Gotch F, Wahren B, Shattock RJ.: **Rational design of HIV vaccines and microbicides: report of the EUROPRISE annual conference 2011.** *J Transl Med* 2012, **10**:144.
409. Russell R, Liang C, Wainberg MA.: **Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably.** *Retrovirology* 2004, **1**:23.
410. Sa Filho D, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM.: **Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in São Paulo, Brazil.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005, **21**(2):145-151.
411. Saag M, Hahn BH, Gibbons J, Li Y, Parks ES, Parks WP, Shaw GM.: **Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo.** *Nature* 1988, **334**(6181):440-444.
412. Sahni A, Prasad VV, Seth P.: **Genomic diversity of human immunodeficiency virus type-1 in India.** *Int J STD AIDS* 2002, **13**(2):115-118.
413. Salazar-Gonzalez J, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, Derdeyn CA, Farmer P, Hunter E, Allen S, Manigart O, Mulenga J, Anderson JA, Swanson R, Haynes BF, Athreya GS, Korber BT, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH.: **Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing.** *J Virol* 2008, **82**(8):3952-3970.
414. Salminen M, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE.: **Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995, **11**(11):1423-1425.
415. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.

416. Santiago M, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Fruteau C, Noë R, Peeters M, Brookfield JF, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.: **Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercopithecus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2.** *J Virol* 2005, **79**(19):12515-12527.
417. Santos A, and Soares MA.: **HIV Genetic Diversity and Drug Resistance.** *Viruses* 2010, **2**(2):503-531.
418. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E.: **Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition.** *J Mol Biol* 2009, **385**(3):693-713.
419. Saragosti S: **Epidémiologie moléculaire du VH-1.** *Virologie* 1997, **1**(4):313-320.
420. Scarlata S, and Carter C.: **Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1614**(1):62-72.
421. Schäfer A, Bogerd HP, Cullen BR.: **Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor.** *Virology* 2004, **328**(2):163-168.
422. Schapiro J, Scherer J, Boucher CA, Baxter JD, Tilke C, Perno CF, Maggiolo F, Santoro MM, Hall DB.: **Improving the prediction of virological response to tipranavir: the development and validation of a tipranavir-weighted mutation score.** *Antivir Ther* 2010, **15**(7):1011-1019.
423. Scherrer AU, Hasse B, von Wyl V, Yerly S, Böni J, Bürgisser P, Klimkait T, Bucher H C, Ledergerber B, Günthard H F: **Prevalence of etravirine mutations and impact on response to treatment in routine clinical care: the Swiss HIV Cohort Study (SHCS).** *HIV Med* 2009, **10**(10):647-656.
424. Schubert U, Bour S, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Maldarell F, Strelbel K.: **The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains.** *J Virol* 1996, **70**(2):809-819.
425. Schubert U, Antón LC, Bacík I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orlowski M, Strelbel K, Yewdell JW.: **CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway.** *J Virol* 1998, **72**(3):2280-2288.
426. Schwartz M, Fiore D, Panganiban AT.: **Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication.** *J Virol* 1997, **71**(12):9295-9305.
427. Semaille C, Cazein F, Lot F, Pillonel J, Le Vu S, Le Strat Y, Bousquet V, Velter A, Barin F.: **Recently acquired HIV infection in men who have sex with men (MSM) in France, 2003-2008.** *Euro Surveill* 2009, **14**(48):pii: 19425.
428. Seyler C, Anglaret X, Dakoury-Dogbo N, Messou E, Touré S, Danel C, Diakité N, Daudié A, Inwoley A, Maurice C, Tonwe-Gold B, Rouet F, N'Dri-Yoman T, Salamon R; ANRS 1203 Study Group.: **Medium-term survival, morbidity and immunovirological evolution in HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy, Abidjan, Côte d'Ivoire.** *Antivir Ther* 2003, **8**(5):385-393.
429. Shafer RW: **Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**(2):247-277.
430. Shah A, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, Barker E.: **Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu.** *Cell Host Microbe* 2010, **8**(5):397-409.

431. Sharma S, Miyanohara A, Friedmann T.: **Separable mechanisms of attachment and cell uptake during retrovirus infection.** *J Virol* 2000, **74**(22):10790-10795.
432. Shun M, Daigle JE, Vandegraaff N, Engelman A.: **Wild-type levels of human immunodeficiency virus type 1 infectivity in the absence of cellular emerin protein.** *J Virol* 2007, **81**(1):166-172.
433. Silvestri G, Fedanov A, Germon S, Kozyr N, Kaiser WJ, Garber DA, McClure H, Feinberg MB, Staprans S. : **Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and non natural rhesus macaque hosts.** *J Virol* 2005, **79**(7):4043-4054.
434. Simon F, Mauclère P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vézinet F.: **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.** *Nat Med* 1998, **4**(9):1032-1037.
435. Simon-Lorière E, Galetto R, Negroni M.: **Caractéristiques mécanistiques de la recombinaison chez le virus de l'immunodéficience humaine.** *Virologie* 2006, **10**(6):431-442.
436. Sinck L, Richer D, Howard J, Alexander M, Purcell DF, Marquet R, Paillart JC.: **In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs.** *RNA* 2007, **13**(12):2141-2150.
437. Sitnikova T: **Bootstrap method of interior-branch test for phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1996, **13**(4):605-611.
438. Sizmann D, Glaubitz J, Simon CO, Goedel S, Buergisser P, Drogan D, Hesse M, Kröh M, Simmler P, Dewald M, Gilsdorf M, Fuerst M, Ineichen R, Kirn A, Pasche P, Wang Z, Weisshaar S, Young K, Haberhausen G, Babiol R.: **Improved HIV-1 RNA quantitation by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 using a novel dual-target approach.** *J Clin Virol* 2010, **49**(1):41-46.
439. Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I.: **Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding.** *Curr HIV Res* 2004, **2**:323-332.
440. Smith D, Richman DD, Little SJ.: **HIV superinfection.** *J Infect Dis* 2005, **192**(3):438-444.
441. Speck R, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B, Goldsmith MA.: **Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop.** *J Virol* 1997, **71**(9):7136-7139.
442. St. Gelais C, Coleman CM, Wang JH, Wu L.: **HIV-1 Nef enhances dendritic cell-mediated viral transmission to CD4+ T cells and promotes T-cell activation.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e34521.
443. Stark LA, and Hay RT.: **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription.** *J Virol* 1998, **72**(4):3037-3044.
444. Steffens C, Hope TJ.: **Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function.** *AIDS* 2001, **15**(Suppl 5):S21-26.
445. Steigbigel R, Cooper DA, Kumar PN.: **Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection.** *NEJM* 2008, **359**:339-354.
446. Steinhauer D, and Holland JJ.: **Rapid evolution of RNA viruses.** *Annu Rev Microbiol* 1986, **41**:409-433.
447. Stelzl E, Pröll J, Bizon B, Niklas N, Danzer M, Hackl C, Stabentheiner S, Gabriel C, Kessler HH.: **Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing:**

- Evaluation of a new ultra-deep sequencing-based protocol and comparison with the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit.** *J Virol Methods* 2011, **178**(1-2):94-97.
448. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA.: **The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity.** *Nature* 1987, **328**(6132):728-730.
449. Strebel K, Klimkait T, Martin MA.: **A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product.** *Science* 1988, **241**(4870):1221-1223.
450. Suhasini M aRT: **Cellular proteins and HIV-1 Rev function.** *Curr HIV Res* 2009, **7**(1):91-100.
451. Sundquist W, Kräusslich HG.: **HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**(7):a006924.
452. Suzuki Y, and Craigie R.: **The road to chromatin–nuclear entry of retroviruses.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:187-196.
453. Suzuki Y, Chew ML, Suzuki Y.: **Role of host-encoded proteins in restriction of retroviral integration.** *Front Microbiol* 2012, **3**:227.
454. Tahirov T, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH.: **Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb.** *Nature* 2010, **465**(7299):747-751.
455. Tang J, Maddali K, Dreis CD, Sham YY, Vince R, Pommier Y, Wang Z.: **N-3 Hydroxylation of Pyrimidine-2,4-diones Yields Dual Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase and Integrase.** *ACS Med Chem Lett* 2011, **2**(1):63-67.
456. Tang M, and Shafer RW.: **HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications.** *Drugs* 2012, **72**(9):e1-25.
457. Tee K, Li XJ, Nohtomi K, Ng KP, Kamarulzaman A, Takebe Y.: **Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, **43**(5):523-529.
458. The ART-LIC of leDEA Study Group: **Switching to second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: comparison of programmes with and without viral load monitoring.** *AIDS* 2009, **23**:1867-1874.
459. Thomas JA, and Gorelick RJ.: **Nucleocapsid protein function in early infection processes.** *Virus Res* 2008, **134**(1-2):39-63.
460. Thomson M, Casado G, Posada D, Sierra M, Nájera R.: **Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba.** *AIDS* 2005, **19**(11):1155-1163.
461. Tiganos E, Yao XJ, Friberg J, Daniel N, Cohen EA.: **Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule.** *J Virol* 1997, **71**(6):4452-4460.
462. Toni T, Adjé-Touré C, Vidal N, Minga A, Huet C, Borger MY, Recordon-Pinson P, Masquelier B, Nolan M, Nkengasong J, Fleury HJ, Delaporte E, Peeters M.: **Presence of CRF09_cpx and complex CRF02_AG/CRF09_cpx recombinant HIV type 1 strains in Côte d'Ivoire, West Africa.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005, **21**(7):667-672.
463. Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, Gaye-Diallo A, Delaporte E, Peeters M, 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.

464. Tournoud M, Etard J F, Ecochard R, DeGruttola V: **Adherence to antiretroviral therapy, virological response, and time to resistance in the Dakar cohort.** *Stat Med* 2010, **29**(1):14-32.
465. Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, Apetrei C, Ekwalanga M, Delaporte E, Peeters M.: **High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa.** . *Virology* 1999, **259**:99-109.
466. Tscherning-Casper C, Vödrös D, Menu E, Aperia K, Fredriksson R, Dolcini G, Chaouat G, Barré-Sinoussi F, Albert J, Fenyö EM.: **Coreceptor usage of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network for In Utero Transmission of HIV-1.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000, **24**(1):1-9.
467. Tsibris AMN, and Hirsch M S.: **Antiretroviral Therapy in the Clinic.** *J Virol* 2010, **84**(11):5458-5464.
468. Turnbull B: **The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data.** *Journal of the Royal Statistical Society* 1976, **38**:290-295.
469. Turner BG, and Summers MF: **Structural Biology of HIV.** *J Mol Biol* 1999, **285**:1-32.
470. UNAIDS: **Report on the global AIDS epidemic.** 2012.
471. Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, G Göttlinger H.: **The ESCRT pathway and HIV-1 budding.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**(Pt 1):181-184.
472. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptué L, Ndembí N, Gürtler L, Devare S, Brennan CA.: **Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon.** *J Virol* 2011, **85**(3):1403-1407.
473. van der Kuyl A, and Cornelissen M.: **Identifying HIV-1 dual infections.** *Retrovirology* 2007, **4**:67.
474. Van Duyne R, Easley R, Wu W, Berro R, Pedati C, Klase Z, Kehn-Hall K, Flynn EK, Symer DE, Kashanchi F.: **Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR.** *Retrovirology* 2008, **5**:40.
475. Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, Keele BF, Shaw KS, Takehisa J, Kraus MH, Loul S, Butel C, Liegeois F, Yangda B, Sharp PM, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M.: **Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas.** *Nature* 2006, **444**(7116):164.
476. Van Maele B, De Rijck J, De Clercq E, Debyser Z.: **Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction.** *J Virol* 2003, **77**:4685-4694.
477. Vandegraaff N, Devroe E, Turlure F, Silver PA, Engelman A.: **Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication.** *Virology* 2006, **346**(2):415-426.
478. Vardabasso C, Manganaro L, Lusic M, Marcello A, Giacca M.: **The histone chaperone protein Nucleosome Assembly Protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription.** *Retrovirology* 2008, **5**:8.
479. Vartanian J, Meyerhans A, Asjö B, Wain-Hobson S.: **Selection, recombination, and G----A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes.** *J Virol Apr;():* 1991, **65**(4):1779-1788.
480. Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, Fawzi W, Hunter D.: **Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**(6):843-852.

481. Velazquez-Campoy A, Vega S, Freire E: **Amplification of the effects of drug resistance mutations by background polymorphisms in HIV-1 protease from African subtypes.** *Biochemistry* 2002, **41**(27):8613-8619.
482. Vella S, Schwartländer B, Sow SP, Eholie SP, Murphy RL.: **The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world.** *AIDS* 2012, **26**(10):1231-1241.
483. Véras N, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR.: **HIV type 1 genetic variability in central Brazil.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, **23**(12):1481-1490.
484. 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.: **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* 2000, **38**(11):3919-3925.
485. Vergne L, Kane C T, Laurent C, Diakhaté N, Gueye N F, Gueye P M, Sow P S, Faye M A, Liégeois F, Ndir A, Lanièce I, Peeters M, Ndoye I, Mboup S, Delaporte E: **Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy.** *AIDS* 2003, **17**(Suppl 3):S31-38.
486. Véronique JaYP: **Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH : une classe thérapeutique d'intérêt majeur chez les patients en échec et ouvrant des perspectives pour les patients naïfs de traitement antirétrovirale.** *Virologie* 2009, **13**:S3-S4.
487. Verrier F, Borman AM, Brand D, Girard M.: **Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999, **15**(8):731-743.
488. Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E.: **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* 2000, **74**(22):10498-10507.
489. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M.: **Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa.** *AIDS Res Hum Retrovir* 2006, **22**:182-187.
490. Vidal N, Diop H, Montavon C, Butel C, Fordant G, Bosch S, Touré-Kane C, Mboup S, Mpoudi Ngole E, Diabouga S, Niyongabo T, Delaporte E, Peeters M.: **Adaptation de la technique de MHA (multiregion hybridization assay) pour l'identification de doubles infections avec un sous-type/CRF différent chez des patients d'Afrique de l'Ouest et Centrale.** *4ème Conférence Francophone VIH/SIDA, Paris* 2007, Résumé N° 62/14A.
491. Vidal N, Bazepeo SE, Mulanga C, Delaporte E, Peeters M.: **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* 2009 ;, **25**(8):823-832.
492. Vidal N, Diop H, Montavon C, Butel C, Bosch S, Ngole EM, Touré-Kane C, Mboup S, Delaporte E, Peeters M.: **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* 2012, [Epub ahead of print].
493. Vink C, and Plasterk RH.: **The human immunodeficiency virus integrase protein.** *Trends Genet* 1993, **9**(12):433-438.

494. Votteler J, Neumann L, Hahn S, Hahn F, Rauch P, Schmidt K, Studtrucker N, Solbak SM, Fossen T, Henklein P, Ott DE, Holland G, Bannert N, Schubert U.: **Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly.** *Retrovirology* 2011, **8**:11.
495. Vrolijk M, Ooms M, Harwig A, Das AT, Berkout B.: **Destabilization of the TAR hairpin affects the structure and function of the HIV-1 leader RNA.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(13):4352-4363.
496. Wade A, Kane CT, Diallo PA, Diop AK, Gueye K, Mboup S, Ndoye I, Lagarde E: **HIV infection and sexually transmitted infections among men who have sex with men in Senegal.** *AIDS* 2005, **19**(18):2133-2140.
497. Wade A, Larmarange J, Diop AK, Diop O, Gueye K, Marra A, Sene A, Enel C, Niang Diallo P, Toure Kane NC, Mboup S, Desgrées-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, **22**(4):409-414.
498. Wallis C, Mellors J, Venter W, Sanne I, Stevens W: **Protease inhibitor resistance is uncommon in patients on failing second-line lopinavir/r-containing regimen in South Africa.** *Antiviral Therapy* 2009, **Suppl 1**:A183.
499. Wallis CL, Mellors J W, Venter W D, Sanne I, Stevens W: **Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010, **53**(4):480-484.
500. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW.: **Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance.** *Genome Res* 2007, **17**(8):1195-1201.
501. Wang K, Samudrala R, Mittler JE.: **Antivirogram or phenosense: a comparison of their reproducibility and an analysis of their correlation.** *Antivir Ther* 2004, **9**(5):703-712.
502. Wang X, Ao Z, Chen L, Kobinger G, Peng J, Yao X.: **The cellular antiviral protein APOBEC3G interacts with HIV-1 reverse transcriptase and inhibits its function during viral replication.** *J Virol* 2012, **86**(7):3777-3786.
503. Warriow D, Meredith L, Davis A, Burrell C, Li P, Harrich D.: **Cell factors stimulate human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in vitro.** *J Virol* 2008, **82**(3):1425-1437.
504. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA.: **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* 1998, **92**(4):451-462.
505. Weidle P, Malamba S, Mwebaze R, Sozi C, Rukundo G, Downing R, Hanson D, Ochola D, Mugenyi P, Mermin J, Samb B, Lackritz E.: **Assessment of a pilot antiretroviral drug therapy programme in Uganda: patients' response, survival, and drug resistance.** *Lancet* 2002, **360**(9326):34-40.
506. Weiss ER, and Göttlinger H.: **The role of cellular factors in promoting HIV budding.** *J Mol Biol* 2011, **410**(4):525-533.
507. Weniger B, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S.: **The molecular epidemiology of HIV in Asia.** *AIDS* 1994, **8**(Suppl 2):S13-28.
508. Wensing A, van Maarseveen NM, Nijhuis M.: **Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance.** *Antiviral Res* 2010, **85**(1):59-74.
509. Westendorp M, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH.: **Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120.** *Nature* 1995, **375**(6531):497-500.

510. Whitcomb J, Parkin NT, Chappay C, Hellmann NS, Petropoulos CJ.: **Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates.** *J Infect Dis* 2003, **188**(7):992-1000.
511. Whitcomb J, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappay C, Kiss LD, Paxinos EE, Petropoulos CJ.: **Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(2):566-575.
512. Wills JW, and Craven RC.: **Form, function, and use of retroviral gag proteins.** *AIDS* 1991, **5**(6):639-654.
513. Womack C, Roth W, Newman C, Rissing JP, Lovell R, Haburchak D, Essex M, Bond VC.: **Identification of non-B human immunodeficiency virus type 1 subtypes in rural Georgia.** *J Infect Dis* 2001, **183**(1):138-142.
514. Wood SN: **Generalized additive models: an introduction with R:** Chapman & Hall/CRC. 2006.
515. Wooley D, Smith RA, Czajak S, Desrosiers RC.: **Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey.** *J Virol* 1997, **71**(12):9650-9653.
516. Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD, Wu L, Xu L, Longo NS, McKee K, O'Dell S, Louder MK, Wycuff DL, Feng Y, Nason M, Doria-Rose N, Connors M, Kwong PD, Roederer M, Wyatt RT, Nabel GJ, Mascola JR.: **Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1.** *Science* 2010, **329**(5993):856-861.
517. Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hunter E, Kappes JC.: **Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein.** *EMBO J* 1997, **16**(16):5113-5122.
518. Yang C, Dash BC, Simon F, van der Groen G, Pieniazek D, Gao F, Hahn BH, Lal RB.: **Detection of diverse variants of human immunodeficiency virus-1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses from chimpanzees by using generic pol and env primer pairs.** *J Infect Dis* 2000, **181**(5):1791-1795.
519. Yang Z, Chakrabarti BK, Xu L, Welcher B, Kong WP, Leung K, Panet A, Mascola JR, Nabel GJ.: **Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope.** *J Virol* 2004, **78**(8):4029-4036.
520. Yeni P: **Prise en charge médicale des personne infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts,** Flammarion edn. Paris,; 2010.
521. Yoshinaga Y, Kanamori-Koyama M, Seki T, Ishida K, Akihisa E, Kobayashi M, Sato A, Fujiwara Shionogi T: **Strong inhibition of wild-type and integrase inhibitor (INI)-resistant HIV integrase (IN) strand transfer reaction by the novel INI S/GSK1349572.** In: *International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop.* Edited by NATAP Crf, vol. Poster. Dubrovnik. Croatia; 2010.
522. Young FE: **The role of the FDA in the effort against AIDS.** *Public Health Rep* 1988, **103**(3):242-245.
523. Young TP, Parkin N T, Stawiski E, Pilot-Matias T, Trinh R, Kempf D J, Norton M: **Prevalence, mutation patterns, and effects on protease inhibitor susceptibility of the L76V mutation in HIV-1 protease.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(11):4903-4906.
524. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau, P.: **HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap.** *Cell* 2000, **101**:173-185.
525. Zhan P, Liu X, Li Z, Panneccouque C, De Clercq E.: **Design strategies of novel NNRTIs to overcome drug resistance.** *Curr Med Chem* 2009, **16**(29):3903-3917.

526. Zhang H, Dornadula G, Orenstein J, Pomerantz RJ.: **Morphologic changes in human immunodeficiency virus type 1 virions secondary to intravirion reverse transcription: evidence indicating that reverse transcription may not take place within the intact viral core.** *J Hum Virol* 2000, **3**(3):165-172.
527. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L.: **The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA.** *Nature* 2003, **424**(6944):94-98.
528. Zhang J, Rhee SY, Taylor J, Shafer RW.: **Comparison of the precision and sensitivity of the Antivirogram and PhenoSense HIV drug susceptibility assays.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **38**(4):439-444.
529. Zheng R, Jenkins TM, Craigie R.: **Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(24):13659-13664.
530. Zhou Q, and Sharp PA.: **Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat.** *EMBO J* 1995, **14**(2):321-328.
531. Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD.: **Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids.** *J Virol* 1994, **68**(4):2556-2569.
532. Zhou Z, Lin X, Madura JD.: **HIV-1 RT nonnucleoside inhibitors and their interaction with RT for antiviral drug development.** *Infect Disord Drug Targets* 2006, **6**:391-413.
533. Zhu P, Chertova E, Bess J Jr, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH.: **Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(26):15812-15817.
534. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR.: **Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids.** *Nature* 2002, **415**(6867):88-92.
535. Zuo Y, Matsusaka T, Zhong J, Ma J, Ma LJ, Hanna Z, Jolicoeur P, Fogo AB, Ichikawa I.: **HIV-1 genes vpr and nef synergistically damage podocytes, leading to glomerulosclerosis.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(10):2832-2843.

ANNEXE

ANNEXE : AUTRE PUBLICATION

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 28, Number 00, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2011.0300

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

Khady Kebe,¹ Moussa Thiam,¹ Ndeye Rama Diagne Gueye,² Halimatou Diop,¹ Aïchatou Dia,² Haby Signate Sy,² Charlotte Charpentier,³ Laurent Belec,³ Souleymane Mboup,¹ and Coumba Toure Kane¹

Abstract

The rates of virological failure (VF) and HIV-1 drug resistance were evaluated in a cross-sectional study in HIV-1-infected children living in Dakar, and taking antiretroviral treatment (ART) according to WHO recommendations. The plasma HIV-1 RNA load was measured using the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assay. The full-length protease gene and partial reverse transcriptase gene were sequenced, and resistance mutations were assessed by reference to the Stanford University HIV drug resistance database. Of 125 included children (median age, 7 years) taking first-line ART for a median duration of 20 months, 82 (66%) showed detectable HIV-1 RNA load, and 70 (56%) met the 2010 revised WHO criteria of VF (defined as plasma HIV-1 RNA load $\geq 3.7 \log_{10}$ copies/ml). Drug resistance results were available for 52 children with plasma HIV-1 RNA load $\geq 3.0 \log_{10}$ copies/ml, and viruses carrying resistance mutations were found in 48 (92%) children. Among these 48, mutations conferring resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) or non-NRTIs (NNRTIs) were found in 42 (88%) and 47 (99%) children, respectively. The NRTI-resistant viruses harbored the M184V/I (95%), Q151M (2%), and thymidine-analogue mutations (40%), and the NNRTI-resistant viruses harbored the K103N (34%), Y181C (32%), G190A (23%), and K101E (21%) mutations. A high rate (56%) of VF was demonstrated in Senegalese children after 20 months of first-line ART and therapeutic failure was assessed by the presence of antiretroviral drug resistance mutations in 9 out of 10 children in VF. These findings point out the difficulties of optimizing ART in children living in sub-Saharan Africa, and the crucial need of laboratory monitoring reinforcement.

Introduction

MORE THAN 90% OF THE 2.5 million children infected by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) live in sub-Saharan Africa.¹ In 2009, an estimated 370,000 children were newly infected, and 260,000 children under the age of 15 died of AIDS.¹ Antiretroviral treatment (ART) intended for children living in a resource-limited setting became available approximately 10 years ago, in parallel with ART access in adults, changing the course of HIV infection and substantially reducing morbidity and mortality.^{2–4}

Children are highly vulnerable to HIV infection, and ART failure, especially in resource-limited settings. Previous studies examining ART in children primarily infected with

non-B HIV-1 subtypes have identified several specific difficulties in treating pediatric HIV infection in a sub-Saharan Africa.⁵ The principal factors compromising ART efficacy in HIV-infected children include the limited number of available pediatric-formulated antiretroviral drugs, the frequently observed poor adherence to drug therapy schedules, and an increased viral load, which may favor the risk of therapeutic failure and drug resistance.^{6–10} While virological failure (VF) is variably defined according to different studies, high rates of VF have been reported in African children treated with ART, ranging from 13% to 75%.^{5,6,10,11–13} Furthermore, plasma HIV-1 variants resistant to at least one antiretroviral drug were found in 71–100% of children with a detectable plasma viral load while on ART.^{5,6,8,11,12,14} The wide heterogeneity in

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Aristide le Dantec, Dakar, Sénégal.

²Hôpital d'Enfants Albert Royer, Dakar, Sénégal.

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Laboratoire de Virologie, and Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

the reported data examining VF in HIV-positive pediatric patients in Africa also suggests that the quality of the public health system could constitute a significant contributing factor in therapeutic failure.¹⁵

For more than 10 years, Senegal has been developing an operational, structured program to prevent the spread of HIV and to provide health care for HIV-infected patients. Therefore, the HIV epidemic has remained concentrated, with a low prevalence in the general population.¹ In addition, the Senegalese Antiretroviral Drug Access Initiative provides free antiretroviral drugs to infected patients. In adults, the rate of therapeutic success was similar to that generally observed in developed countries, reaching 84% after 24 months of highly active ART,¹⁶ indicating the efficacy of the health care afforded to HIV-infected individuals in Senegal.

However, Senegalese pediatric cohorts receiving ART still have not been biologically evaluated, despite the high risk of therapeutic failure in antiretroviral drug-treated children previously reported in several African countries.^{5,14} This prompted us to evaluate the rate of VF as well as the rate of therapeutic failure as assessed by drug resistance mutation profiles, in a cohort of HIV-1-infected children living in Dakar and receiving first-line ART according to the World Health Organization (WHO) recommendations for resource-constrained countries.¹⁷

Materials and Methods

Study population

In 2010, a cross-sectional study of HIV-1-infected children followed at the Hôpital d'Enfants Albert Royer of Dakar was conducted. In this principal health care center for pediatric AIDS in Senegal, physicians used the 2006 revised WHO recommendations for the management of pediatric HIV infection.¹⁷ Thus, ART was indicated based on clinical staging and the CD4 T cell count. The recommended ART in children was a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) with one non-NRTI (NNRTI).¹⁷ Children aged less than 15 years, and treated with NRTI- and NNRTI-based first-line ART for at least 6 months, were included for the study. Feedback was given to the pediatricians and children's parents on all tested parameters carried out during the study period.

Virological analyses

Two aliquots of a K₃-EDTA blood sample obtained by venipuncture in pediatric Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was obtained and plasma was kept at -80°C until processing.

The plasma HIV-1 viral load was measured using the Abbott m2000 Real Time HIV-1 assay (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). The lower limit of detection for the assay is 40 copies/ml.¹⁸

Genotypic resistance testing was performed in treated children whose HIV-1 RNA load was greater than 3.0 log₁₀ copies/ml at the time of virological analysis. HIV-1 RNA was extracted from plasma samples using the QIAamp Viral RNA Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Sequencing of the protease and reverse transcriptase (RT) genes was performed according to the consensus technique of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS,

Paris, France), as previously described.¹⁹ Genotypic resistance was defined as the presence of antiretroviral drug resistance mutations associated with impaired drug susceptibility, using the Stanford University HIV drug resistance database (<http://hivdb.stanford.edu>). To classify the HIV-1 strains according to subtype, phylogenetic analyses were performed by estimating the relationships between *pol* sequences, HIV-1 subtype reference sequences, and the circulating recombinant forms (CRF) using the Rega HIV subtyping tool program version 2.0.²⁰

The protease and RT sequences were submitted to GenBank with the following accession numbers: HM002496, HM002497, HM002502, HM002505 to HM002508, HM002510, HM002512 to HM002521, HM002523, HM002524, HM002526, HM002528 to HM002533, HM002535, HM002537 to HM002541, HM002545, JN193483 to JN193492, and JN193494 to JN193501.

Results

Study population and HIV-1 RNA load distribution

A total of 125 HIV-1-infected children receiving first-line ART for at least 6 months were included. The median age was 7 years [interquartile range (IQR), 2–15 years], and 51 (40%) were female. The main therapeutic combination used was zidovudine (AZT)/lamivudine (3TC)/nevirapine (NVP). The median duration of treatment was 20 months (IQR, 6–120 months).

Among the 125 children, 60 had viral load at 6 months of ART, 75 had viral load at 12 months of ART, and 66 had viral load at 24 months of therapy. The rates of virological failure according to 2010 revised WHO criteria, after 6, 12, and 24 months of ART, were 32%, 53%, and 55%, respectively.

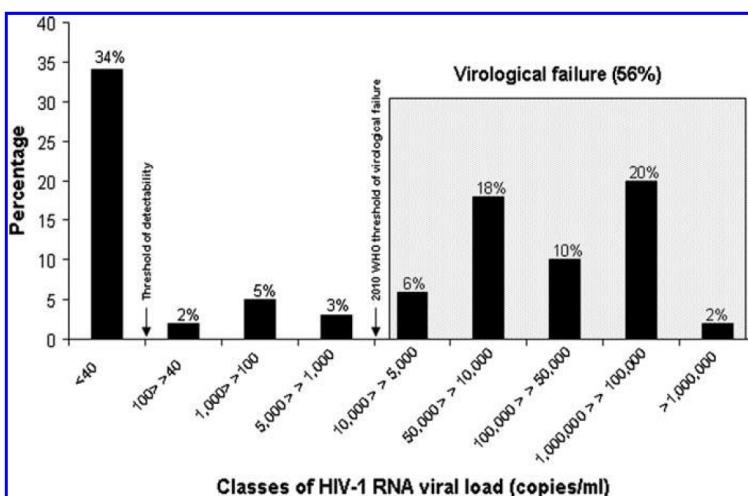
Among the 125 study children who had virological analysis carried out after a median duration on ART of 20 months, 43 (34%) had an undetectable HIV-1 viral load whereas 82 (66%) displayed detectable HIV-1 viremia, with a median viral load of 5.0 log₁₀ copies/ml (IQR: 2.0–7.0 log₁₀ copies/ml) (Fig. 1); eight (6%) children showed a detectable HIV-1 RNA load less than 3.0 log₁₀ copies/ml, four (3%) had a plasma HIV-1 RNA load between 3.0 and 3.7 log₁₀ copies/ml, and 70 (56%) displayed a viral load greater than 3.7 log₁₀ copies/ml (5,000 copies/ml), e.g., the threshold of VF according to the 2010 revised WHO criteria.²¹

Among the 43 children with undetectable plasma HIV-1 RNA load, 22 (51%) never had an interruption in treatment, based on pharmacy refill records. The remaining 21 children (49%) had at least one treatment interruption, with a median duration of 53 days (IQR, 20–150 days). Of the 82 children with detectable HIV-1 RNA load, 59 (72%) had at least one treatment interruption with a median duration of 60 days (IQR, 12–160 days). The percentage of episodes of treatment interruption was higher in children with detectable HIV-1 RNA load than in those with undetectable load ($p < 0.025$ by χ^2 test). A possible relationship of treatment interruption and treatment complication or side-effects could not be documented.

Genotypic resistance profiles

Genotypic resistance test results were available for viruses isolated from the plasma of 52 study children with HIV-1

FIG. 1. Distribution of plasma HIV-1 RNA viral load in 125 children receiving first-line antiretroviral treatment according to the WHO recommendations, and followed-up in the Hôpital d'Enfants Albert Royer of Dakar, Senegal. The threshold of HIV-1 RNA load detection of the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assay (40 copies/ml) and the threshold of virological failure according to the 2010 revised (5,000 or $3.7 \log_{10}$ copies/ml) WHO criteria are indicated.



RNA load greater than $3 \log_{10}$ copies/ml. The median duration of ART at the time of genotyping was 26 months (IQR, 8–84 months). The antiretroviral drug combinations used were AZT/3TC/NVP (65%), stavudine (d4T)/3TC/NVP (19%), AZT/3TC/efavirenz (EFV) (12%), d4T/3TC/EFV (2%), and AZT/abacavir (ABC)/EFV (2%). The median viral load at the time of genotyping was $4.9 \log_{10}$ copies/ml (IQR, 3.2 – $6.8 \log_{10}$ copies/ml); 49 (94%) children were in VF according to the WHO 2010 revised criteria. Based on pharmacy refill records, at least one treatment interruption occurred in 45 (87%) out of the 52 children.

Among the 52 children with available genotypic results, only four children (8%) had viruses remaining sensitive to NRTI, NNRTI, and protease inhibitor (PI) classes. Mutations conferring resistance to at least one antiretroviral drug were found in 48 (92%) children, and resistance to both NRTIs and NNRTIs was present in 42 (88%) children.

Three out of the 48 (6%) children whose viruses showed drug resistance mutations had plasma HIV-1 RNA load between 3.0 and $3.7 \log_{10}$ copies/ml. Based on WHO 2010 VF criteria, these children would not have been included.

The median number of drug resistance mutations observed was three (ranging from one to nine mutations). No correlation could be found between that median number of drug resistance mutations and therapy duration (by linear regression; $p > 0.05$).

NRTI resistance mutations. Major mutations conferring drug resistance to NRTIs were found in viruses isolated from 42 (88%) of the 48 children with drug-resistant viruses. The M184V/I mutation was identified in viral isolates from 40 (95%) of the 42 children with NRTI-resistant viruses, while the Q151M mutation was detected in only one (2%) of these children (Fig. 2A). The patient with Q151M had been receiving AZT/3TC/NVP for 34 months and had 90 days of treatment interruption. Thymidine-analogue mutations (TAMs) were present in viruses from 17 (40%) of the 42 children, and included the following mutations: T215Y/F in 16 genotypes (38%), L210W in eight (19%), M41L in eight (19%), D67N in five (12%), K70R in four (10%), and K219Q/E in four (10%). Of

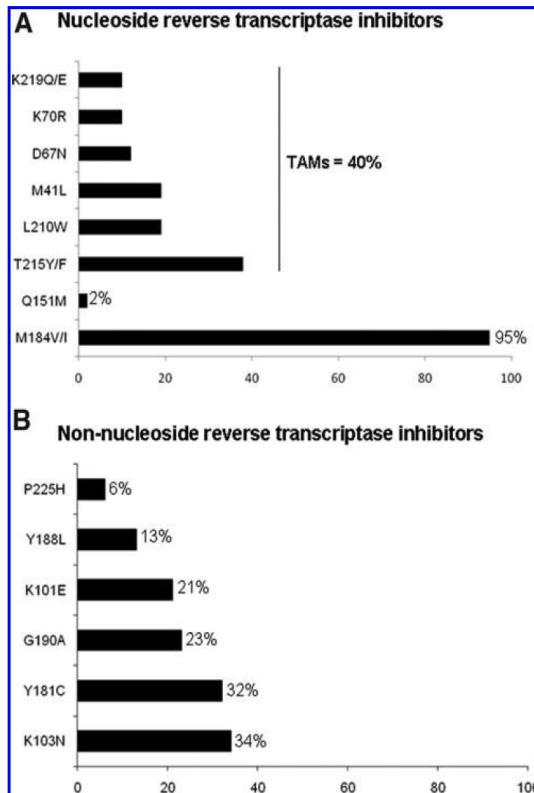


FIG. 2. Percentages of resistance-associated mutations to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (A) and to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (B) observed in children followed-up at the Hôpital d'Enfants Albert Royer of Dakar, Senegal, who were receiving a first-line antiretroviral regimen for a median time of 26 months, and whose plasma HIV-1 RNA load was $\geq 3.0 \log_{10}$ copies/ml. Forty-nine (94%) children were in virological failure according to the 2010 revised criteria. TAMs, thymidine-analogue mutations.

the 17 children infected with TAM-containing viruses, eight (47%) carried viruses with at least three TAMs. The M184V mutation was found in combination with at least one TAM in viral isolates from 16 (38%) of the 42 children infected with NRTI-resistant viruses. If the M184V mutation was excluded, eight (17%) children who received a first-line regimen had viruses harboring at least one drug-resistant mutation to an NRTI or NNRTI.

Multi-NRTI resistance was found in 18 children (43%) out of the 42 with viruses harboring NRTI resistance mutations. Among the 18 cases, the main profiles were as follows: M184V-T215Y/F in 15 (83%), M184V-T215Y/F-L210W in seven (39%), M184V-T215Y/F-M41L in six (33%), and M184V-T215Y/F-D67N in three (17%). The median duration on ART was 34 months (13–84 months).

Among the 42 children with NRTI-resistant viruses, 24 (57%) had a single resistance mutation. The main mutation was M184V/I found in 23 cases (96%). The median duration on ART was 27 months (7–59 months). Based on ART duration, no difference could be found between the group with multi-NRTI resistance and the one with a single resistance mutation ($p > 0.05$).

NNRTI resistance mutations. At least one NNRTI resistance mutation was found in viral isolates from 47 (99%) of the 48 children with drug-resistant viruses. The pattern of NNRTI resistance mutations was as follows: K103N in 16 genotypes (34%), Y181C in 15 (32%), G190A in 11 (23%), and K101E in 10 (21%) (Fig. 2B). NNRTI resistance profiles were not different in children failing NVP compared to EFV.

Multi-NNRTI resistance was found in 27 children (57%) out of the 47 having viruses harboring NNRTI resistance mutations. Among those 27, the main patterns of mutations were K101E-G190A in eight (30%), K103N-Y181C in three (11%), and K101E-Y181C in three (11%). The median duration on ART was 29 months (7–84 months). Twenty children out of the 47 with NNRTI-resistant viruses had single resistance mutation. The main mutations were K103N in eight (40%), Y188L in five (25%), and Y181C in five (25%). The median duration on ART in these latter children was 24 months (11–79 months). No difference on ART duration could be found between the group with multi-NNRTI resistance and the one with a single resistance mutation.

Among the 48 study children with resistant viruses, eight children (17%) had viruses harboring both multi-NRTI and multi-NNRTI resistance mutations. The median duration on ART in these latter children was 34 months (18–84 months).

Considering the patterns of NRTI and NNRTI resistance mutations, no correlation could be found with therapy duration.

PI resistance mutations. No major mutations conferring PI resistance were detected.

HIV-1 genetic diversity

Phylogenetic analysis of the 52 genotyped viral isolates showed that CRF02_AG was most represented with 39 viral isolates (75%) (Fig. 3). Subtype C was found in three (6%) cases and CRF06_cpx was found in one child (2%). HIV-1 subtypes D and G were each found in one child (2%). Recombinant viruses were also found: CRF02_AG/A1 in two

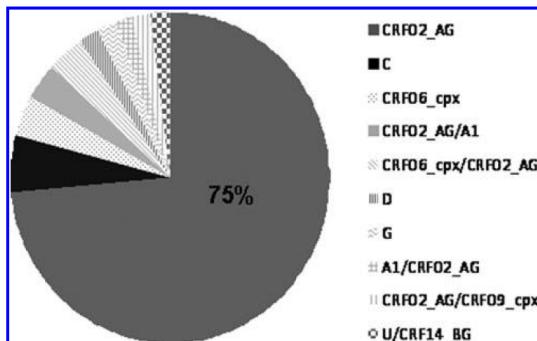


FIG. 3. Distribution of HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms among 52 HIV-1-infected children followed in Dakar, Senegal, treated by first-line antiretroviral drugs.

cases, CRF06_cpx/CRF02_AG in two cases, and A1/CRF02_AG, CRF02_AG/CRF09_cpx, and U/CRF14_BG in one child each. There was no relationship between resistance mutations patterns and HIV-1 subtypes.

Interpretation of genotypic resistance tests and possible future therapeutic options

Genotypic resistance profiles were interpreted according to the Stanford University HIV drug resistance database for all drugs proposed for second-line regimens, according to the revised 2010 WHO recommendations.

Among the 48 sequenced viruses found in children in first-line regimen and harboring resistance mutations, 36 (75%), 38 (79%), and 39 (81%) remained susceptible to ABC, ddI, and tenofovir (TDF), respectively. These data show that the NRTI drugs recommended by the WHO for second-line regimens in Africa are expected to be active in the majority ($\geq 75\%$) of children requiring therapeutic switch. Conversely, the use of first-generation NNRTIs appeared largely compromised in children taking first-line ART in VF, as 90% of them showed circulating viruses resistant to EFV and NVP. Moreover, resistance to etravirine (ETR), a newly available second-generation NNRTI, was observed in 10 viruses (21%), including an intermediate level of resistance in four, a low level in three, and a high level of resistance in three viruses. The PI drug class remained fully active in all children after first-line therapeutic failure.

Discussion

In the present series of Senegalese HIV-1-infected children, more than half of the children taking ART according to the WHO recommendations for resource-poor countries for 20 months in median were in VF according to the 2010 revised criteria. Furthermore, 92% of children in VF harbored resistant viruses, and 17% of them showed at least one major drug resistance mutation to NRTI or NNRTI after excluding the M184V mutation. The rate of VF in the present study children under first-line ART (56%) appears higher than those previously reported in Uganda (13–26%),^{13,22} South Africa (16%),²³ Thailand (16%),²⁴ Mali (44%),¹² and Cambodia (19%),²⁵ but similar to that previously reported in children living in Bangui, Central African Republic after 6 months of ART.¹⁰ These

observations indicate that the risk of therapeutic failure in treated children is high, even in countries whose health care system and care of HIV-infected adults is associated with high rates of therapeutic success, such as Senegal.¹⁶ Treatment of pediatric HIV infection remains difficult, mainly because the ART options are limited, the pediatric dosing of antiretroviral drugs is complicated, and adherence to treatment is challenging to achieve, so that complete suppression is rarely observed.¹⁰ Taken together, these observations confirm that virological suppression and long-term ART success are more difficult to achieve in children than in adults.²⁶

Three study children whose viruses showed antiretroviral drug resistance mutations had plasma HIV-1 RNA load between 3.0 and 3.7 log₁₀ copies/ml, thus demonstrating that therapeutic failure may be underdiagnosed with the current criteria of VF according to the 2010 revised WHO criteria (e.g., plasma HIV-1 RNA $\geq 3.7 \log_{10}$ copies/ml).²¹ Whether persistent low levels of viral replication may be associated with therapeutic failure in children taking ART warrants further investigation. These findings indicate that maintaining first-line ARV treatment, despite a detectable viral load, is associated over time with an increased risk of increased plasma viral load and further VF, and also confirm and emphasize the need in antiretroviral-treated children to improve biological monitoring in order to diagnose VF as early as possible with the aim of preserving future therapeutic options.

The viruses isolated from the majority of antiretroviral drug-treated children in VF carried resistance mutations to NRTIs or NNRTIs. The high selection rates of TAMs and NNRTI resistance mutations in the present study children are likely associated with the prolonged duration of ART. Similar high prevalences of resistance mutations have been reported in children in VF living in other sub-Saharan African countries who were also infected with various non-B subtypes, including Ivory Coast (71%),⁶ Central Africa Republic (77%¹⁰ and 85%),¹⁴ Mozambique (92%),¹¹ South Africa (98%),²⁷ Uganda (100%),²⁸ and Kenya (100%),⁸ as well as in those living in developed countries where infection with subtype B predominates.²⁹ A high rate of drug resistance was also found in children in Thailand, where the main circulating form of HIV-1 is CRF01_AE.³⁰ In our series, the distribution of HIV-1 subtypes was similar to that previously reported in Senegalese adults,¹⁶ with a predominance of the CRF02_AG subtype. Furthermore, no relationship between resistance mutations patterns and HIV-1 subtypes could be evidenced. Taken together, these findings confirm that the rate of antiretroviral drug resistance mutation selection does not appear to be influenced by viral genetic diversity, as previously observed.^{6,31}

The M184V/I mutation was the most commonly observed (95%) NRTI resistance mutation, most likely due to the systematic use of 3TC^{32,33} in ART regimens recommended by the 2006 and 2010 revised WHO guidelines for pediatric AIDS in resource-poor regions.^{17,21} According to the WHO guidelines, the presence of the M184V resistance mutation, which confers resistance to 3TC/emtricitabine (FTC), does not preclude further systematic use of 3TC/FTC in a second-line treatment. Furthermore, the systematic use of 3TC/FTC in second-line WHO-recommended regimens of ART is thought to be beneficial, because of decreased viral fitness of HIV-1 strains mutated at codon 184.^{34,35} However, the effective *in vivo* impact of the M184V resistance mutation in children receiving

second-line treatment should be further investigated in African pediatric cohorts. Furthermore, in adults infected with HIV-1 subtype B, the M184V mutation has been demonstrated to delay the emergence of TAMs,^{36–38} suggesting that it would remain advantageous to maintain 3TC-containing treatment even in patients with a detectable viral load.³⁶ In the present cohort, TAMs were found in more than one-third (40%) of children harboring NRTI-resistant viruses, most likely due to the large use of AZT in the pediatric first-line WHO-recommended regimen.^{17,21} The relatively middle proportion (40%) of TAMs selection in study children in therapeutic failure may be in part explained by the high frequency of the M184V mutation, conferring increased sensitivity to AZT and d4T, thus contributing to the lower frequency of TAMs.^{36,39} Whether the selection of TAMs in the present population of children mainly infected with non-B subtypes would have been hampered by the previous selection of the M184V mutation would need further investigation. Furthermore, the low rate of TAMs makes it possible to conserve sensitivity to TDF, whose resistance needs the accumulation of at least three TAMs.⁴⁰ Nearly all children (99%) infected with viruses carrying genotypic resistance mutations had viruses harboring resistance mutations to NNRTIs. This resistance pattern is most likely due to the wide use of NVP or EFV, two drugs with a low genetic barrier to resistance selection,^{41,42} or to the previous selection of NNRTI resistance mutations in mothers receiving chemoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission.⁴³ Finally, in the present series, the antiviral activity of antiretroviral drugs of the second-line regimens proposed by the 2010 revised WHO recommendations in case of VF was not largely impacted, with a predictive activity of ABC, ddI, and TDF in 75%, 79%, and 93% of cases, respectively.

Compliance to ART continues to remain a major concern of caring for HIV-infected children.⁴⁴ In the present study, the rate of treatment interruption was higher in treated children in VF than in those with undetectable plasma HIV-1 RNA load. Treatment interruption provides problems of adherence, which constitutes a crucial factor in the effectiveness of ART. Interestingly, some study children were in VF and showed circulating viruses harboring antiretroviral drug resistance mutations, despite the lack of treatment interruption, as assessed by pharmacy refill records. This observation suggests the possibility of an initial infection with primary resistant viruses. Indeed, drug resistance-associated mutations in untreated children have been reported in sub-Saharan African countries where single-dose NVP is widely used for preventing HIV mother-to-child transmission.^{45,46} In addition, even with good pharmacy refill records, poor adherence at home may account for therapeutic failure.

Remarkably, wild-type viruses sensitive to all major antiretroviral drug classes were detected in 8% of children receiving first-line ART in VF (plasma viral load $> 3.7 \log_{10}$ copies/ml). This finding is reminiscent of the 20% rate found in adult patients displaying VF associated with wild-type viruses, previously reported in Douala⁴⁷ and in Bangui.¹⁴ VF associated with wild-type viruses is likely due to poor adherence, which needs urgent correction. Indeed, the level of adherence in antiretroviral drug-treated children was found to be inversely associated with HIV-1 RNA plasma level after 6 months of ART.¹⁰ Virological monitoring appears to be a particular challenge in HIV-infected children who are known

to have difficulties in maintaining good adherence. In addition to poor adherence, the toxicity of antiretroviral drugs may also make it necessary to opt for an alternative first-line or second-line regimen, as previously reported in 2% of antiretroviral drug-experienced children living in Malawi.⁴⁸

In the present series, 45 (94%) out of the 48 children with viruses carrying NNRTI resistance mutations needed a second-line, PI-based regimen, as both NVP and EFV could no longer be used. Based on results from genotypic resistance tests, interpreted by the Stanford University HIV drug resistance database, the activity of ETR may be compromised in about 21% of circulating HIV-1 strains, as previously reported in Bangui.¹⁴ Such a prevalence of predicted ETR resistance appears much higher than rates (2.4–3.8%) previously reported in Western countries.^{49,50} In the present series, primary resistance to ETR may reflect possible genetic specificity of HIV-1 non-B subtypes,⁵¹ in addition to the long duration of viral replication under first-generation NNRTI drugs in Africa. However, at present ETR cannot be recommended in pediatric AIDS treatment, due to the lack of a pediatric formulation, and pharmacokinetic, efficacy, and safety data in children. Lopinavir boosted with ritonavir could still be used in a second-line regimen. Finally, two children had viruses harboring resistance mutations to all WHO-recommended NNRTIs and NRTIs. In these latter children, the second-line regimen would require antiretroviral drugs not yet available in Senegal.

In conclusion, a high prevalence of NRTI and NNRTI resistance mutations was observed in Senegalese children receiving NRTI- and NNRTI-based antiretroviral drug regimens recommended by the WHO and experiencing VF. This finding has important public health implications, and emphasizes the need to improve the distribution of antiretroviral drugs in order to prevent therapeutic interruption, to increase adherence in treated children, and to offer adequate HIV biological monitoring with early diagnosis of VF. Furthermore, it emphasizes the need to provide more options for second-line regimens in children under ART, especially in the context of resource-limited settings, where the availability of affordable antiretroviral drugs is limited.

Acknowledgments

We express our gratitude to the Senegalese Ministry of Health and the National AIDS and STIs Division. We also thank the Pr Annemie Vandamme for her assistance. The study was supported by the Senegal's National AIDS Program and the Chain project.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: Report on the Global AIDS Epidemic. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 2010. Accessed May 2011. Available from http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2010/20101123_globalreport_en.pdf.
- Manosuthi W, Chottanapand S, Thongyen S, Chaovavanich A, and Sungkanuparph S: Survival rate and risk factors of mortality among HIV/tuberculosis-coinfected patients with and without antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;43:42–46.
- Puthanakit T, Aurpibul L, Oberdorfer P, et al.: Hospitalization and mortality among HIV-infected children after receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2007;44:599–604.
- Patel K, Hernán MA, Williams PL, et al.: Long-term effects of highly active antiretroviral therapy on CD4+ cell evolution among children and adolescents infected with HIV: 5 years and counting. *Clin Infect Dis* 2008;46:1751–1760.
- Signaloff KC, Calis JC, Geelen SP, van Vugt M, and de Wit TF: HIV-1-resistance-associated mutations after failure of first-line antiretroviral treatment among children in resource-poor regions: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 2011; 11:769–779.
- Chaix ML, Rouet F, Kouakoussui KA, et al.: Genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated children in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1072–1076.
- Averbuch D, Schapiro JM, Lanier ER, et al.: Diminished selection for thymidine-analog mutations associated with the presence of M184V in Ethiopian children infected with HIV subtype C receiving lamivudine-containing therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:1049–1056.
- Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, et al.: Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol* 2007;79:865–872.
- Adjé-Touré C, Hanson DL, Talla-Nzussou N, et al.: Viralologic and immunologic response to antiretroviral therapy and predictors of HIV type 1 drug resistance in children receiving treatment in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:911–917.
- Gody JC, Charpentier C, Mbitikon O, et al.: High prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-1 non-B subtype strains from African children receiving antiretroviral therapy regimen according to the 2006 revised WHO recommendations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49:566–569.
- Vaz P, Chaix ML, Jani I, et al.: Risk of extended viral resistance in human immunodeficiency virus-1-infected Mozambican children after first-line treatment failure. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:e283–287.
- Germanaud D, Derache A, Traore M, et al.: Level of viral load and antiretroviral resistance after 6 months of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor first-line treatment in HIV-1-infected children in Mali. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:118–124.
- Ruel TD, Kamya MR, Li P, et al.: Early failure and the development of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-infected Ugandan children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;56:44–50.
- Charpentier C, Gody JC, Mbitikon O, et al.: Virological response and resistance profiles after 18 to 30 months of first- or second-/third-line antiretroviral treatment: A cross-sectional evaluation in HIV type 1-infected children living in Central African Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28:87–94.
- Hamers RL, Derdelinckx I, van Vugt M, Stevens W, Rinke de Wit TF, and Schuurman R: The status of HIV-1 resistance to antiretroviral drugs in sub-Saharan Africa. *Antivir Ther* 2008;13:625–639.

16. Vergne L, Kane CT, Laurent C, et al.: Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17: S31–38.
17. World Health Organization: Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: Toward universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva, World Health Organization 2007. Accessed January 2010. Available from <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/paediatric020907.pdf>.
18. Schutten M, Peters D, Back NK, et al.: Multicenter evaluation of the new Abbott RealTime assays for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2007;45:1712–1717.
19. Pasquier C, Millot N, and Njouom R: HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *J Virol Methods* 2001;94:45–54.
20. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, et al.: An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005;21:3797–3800.
21. World Health Organization: Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: Towards universal access. Recommendations for a public health approach. World Health Organization 2010. Accessed July 2011. Available from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf.
22. Kamya MR, Mayanja-Kizza H, Kambugu A, et al.: Predictors of long-term viral failure among Ugandan children and adults treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46:187–193.
23. Reddi A, Leeper SC, Grobler AC, et al.: Preliminary outcomes of a paediatric highly active antiretroviral therapy cohort from Kwazulu-Natal, South Africa. *BMC Pediatr* 2007;17:7–13.
24. Jittamala P, Puthanakit T, Chaiinseeard S, and Sirisantha V: Predictors of virologic failure and genotypic resistance mutation patterns in Thai children receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:826–830.
25. Janssens B, Raleigh B, Soeung S, et al.: Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in HIV-positive children: Evaluation at 12 months in a routine program in Cambodia. *Pediatrics* 2007;120:e1134–1140.
26. van Rossum AM, Fraaij PL, and de Groot R: Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected children. *Lancet Infect Dis* 2002;2:93–102.
27. Wallis CL, Erasmus L, Varughese S, Ndiweni D, and Stevens WS: Emergence of drug resistance in HIV-1 subtype C infected children failing the South African national antiretroviral roll-out program. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28: 1123–1125.
28. Towler WI, Barlow-Mosha L, Church JD, et al.: Analysis of drug resistance in children receiving antiretroviral therapy for treatment of HIV-1 infection in Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26:563–568.
29. Delaugerre C, Chaix M L, Warszawski J, Rouzioux C, and Blanche S: HIV-1 drug resistance in French infected-children: From newborn to adolescent. *Arch Pediatr* 2007;14: 298–302.
30. Podjanee J, Thanyawee P, Sukrappee C, and Virat S: Predictors of virologic failure and genotypic resistance mutation patterns in Thai children receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:826–830.
31. Montes B, Vergne L, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, and Segondy M: Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:329–336.
32. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, et al.: Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* 1995;171: 1411–1419.
33. Zaccarelli M, Perno CF, Forbici F, et al.: Using a database of HIV patients undergoing genotypic resistance test after HAART failure to understand the dynamics of M184V mutation. *Antivir Ther* 2003;8:51–56.
34. Turner D, Brenner BG, Routy JP, Petrella M, and Wainberg MA: Rationale for maintenance of the M184V resistance mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in treatment experienced patients. *New Microbiol* 2004;27:31–39.
35. Paredes R, Sagar M, Marconi VC, et al.: In vivo fitness cost of the M184V mutation in multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of lamivudine. *J Virol* 2009;83:2038–2043.
36. Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, et al.: Mutations in HIV-1 reverse transcriptase during therapy with abacavir, lamivudine and zidovudine in HIV-1 infected adults with no prior antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2002;7:43–51.
37. Ait-Khaled M, Stone C, Amphlett G, et al.: M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. *AIDS* 2002;16:1686–1689.
38. Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, et al.: HIV-1 reverse transcriptase and protease resistance mutations selected during 16–72 weeks of therapy in isolates from antiviral therapy-experienced patients receiving abacavir/efavirenz/amprenavir in the CAN 2007 study. *Antivir Ther* 2003;8: 111–120.
39. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, and Hughes SH: The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2002;76:3248–3256.
40. Masquelier B, Tamalet C, Montès B, et al.: Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* 2004;9:315–323.
41. Bacheler L, Jeffrey S, Hanna G, et al.: Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol* 2001;75:4999–5008.
42. Casado JL, Hertogs K, Ruiz L, et al.: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. *AIDS* 2000;14:F1–7.
43. Arrivé E, Newell ML, Ekouevi DK, et al.: Prevalence of resistance to nevirapine in mothers and children after single-dose exposure to prevent vertical transmission of HIV-1: A meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2007;36:1009–1021.
44. Haberer JE, Cook A, Walker AS, et al.: Excellent adherence to antiretrovirals in HIV+ Zambian children is compromised by disrupted routine, HIV nondisclosure, and paradoxical income effects. *PLoS One* 2011;6:e18505.
45. van Zyl GU, Cotton MF, Claassen M, Abrahams C, and Preiser W: Surveillance of transmitted resistance to antiretroviral drug

- classes among young children in the Western Cape Province of South Africa. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:370–371.
46. Charpentier C, Gody JC, Tisserand P, et al.: Surveillance of antiretroviral drug resistance mutations in untreated young children living in the Central African Republic. *Antiviral Ther* 2011;16:1347–1350.
 47. Charpentier C, Talla F, Nguepi E, Si-Mohamed A, and Bélec L: Virological failure and HIV type 1 drug resistance profiles among patients followed-up in private sector, Douala, Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27:221–230.
 48. Buck WC, Kabue MM, Kazembe PN, and Kline MW: Discontinuation of standard first-line antiretroviral therapy in a cohort of 1434 Malawian children. *J Int AIDS Soc* 2010;13:31.
 49. Cotte L, Trabaud MA, Tardy JC, et al.: Prediction of the virological response to etravirine in clinical practice: Comparison of three genotype algorithms. *J Med Virol* 2009; 81:672–677.
 50. Scherrer AU, Hasse B, von Wyl V, et al.: Prevalence of etravirine mutations and impact on response to treatment in routine clinical care: The Swiss HIV Cohort Study (SHCS). *HIV Med* 2009;10:647–656.
 51. Maiga AI, Descamps D, Morand-Joubert L, et al.: Resistance-associated mutations to etravirine (TMC-125) in anti-retroviral-naïve patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:728–733.

Address correspondence to:

Coumba Touré Kane
Université Cheikh Anta Diop
and Laboratoire de Bactériologie-Virologie
CHU Aristide Le Dantec

Dakar
Sénégal

E-mail: ctourekane@yahoo.co.uk

RESUME

Auteur : Moussa THIAM

Résumé

L'Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux (ISAARV) a été lancée depuis 1998 et les patients sont suivis soit à travers des cohortes observationnelles comme celle du projet ANRS 1215, soit selon l'approche santé publique de l'OMS. L'émergence de virus résistants sous pression médicamenteuse est inévitable suite à la sélection de mutations au niveau des gènes cibles des ARVs. La détection de ces mutations de résistance peut être difficile, liée à la diversité des souches de VIH-1 et pose ainsi le problème d'une technique d'étude appropriée. Entre autre, la survenue de surinfections est une des conséquences liée à un traitement ARV non efficace et à long terme. Nos travaux scientifiques ont donné des résultats concluant. Les données obtenues de l'ANRS 1215 ont démontré un succès virologique de 89% chez les patients en 1^{ère} ligne. Cependant, l'échec virologique durant la mise sous ARV de 2nd ligne apparaît très tôt après le changement de ligne. L'étude transversale réalisée chez des patients suivis selon l'approche de santé publique, a montré qu'un nombre élevé (76,39%) de patients a développé au moins une mutation de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 40 mois. Parmi les mutations associées à une résistance aux INTIs, nous avons trouvé une prédominance des TAMs (50,79%) suivis de la mutation M184V/I (34,92%) et une prédominance du K103N (46,27%) pour les INNTIs. L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 au Sénégal a été confirmée avec une prédominance du CRF02_AG (59,72%). L'étude des performances du ViroSeq montre un taux d'amplification et de séquençage qui sont respectivement de 98% et de 96,60%. L'analyse des performances pour les amores de séquençage a montré 100% de succès pour l'amorce B alors que le taux d'échec variait entre 1,40 à 71,40% pour les autres amores. Par ailleurs, un traitement ARV non efficace a été à l'origine de la survenue d'une surinfection chez un couple séroconcordant. L'ensemble de ces résultats pose le problème d'une prévalence élevée de résistances aux ARV et une accumulation des mutations de résistance d'où la nécessité impérieuse d'améliorer le monitoring virologique des patients sous ARV et de disposer d'un schéma thérapeutique de 3^{ième} ligne. Ils montrent aussi la nécessité de disposer de techniques alternatives pour le génotypage des VIH-1 sous type non-B. Enfin, ils mettent l'accent sur le risque de nouvelles transmissions dans les couples séroconcordants.

HIV-1 ACQUIRED DRUG RESISTANCE AMONG PATIENTS OF ISAARV: EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS AND GENOTYPING TECHNIQUES

Summary

Since 1998, a national antiretroviral treatment (ART) program has been launched in Senegal and the patients are followed by an observational cohort study like the ANRS 1215 cohort or by the WHO guidelines. The emergence of HIV-1 drug resistance is inevitable due to the mutations in the protease and reverse transcriptase *pol* gene. The detection of those resistance mutations could be difficult due to the HIV-1 genetic diversity and compromises the uses of an appropriate genotyping technique. Otherwise, the occurrence of HIV-1 superinfection is one among the consequences of a long-term use of an ineffective ART. Our different studies gave interesting results. Data from the ANRS 1215 cohort showed that 89% of patients have achieved a virological success. However, the virological failure while receiving second-line regimens occurred early on after switching. The cross-sectional study among patients in the public health system showed a high number of patients (76,39%) with at least one drug resistance mutation after 40 months of median follow-up. For NRTI mutations, we had a high rate of TAMs (50,79%) followed by the M184V/I (34,92%). The K103N (46,27%) was predominant among the NNRTI mutations. The HIV-1 genetic diversity in Senegal was confirmed by the predominance of the CRF02_AG (59,72%). The study on the performance of the ViroSeq showed that the amplification and sequencing rate were respectively 98% and 96,60%. The primer performances were 100% for the primer B, while the failure rate ranged from 1,40% to 71,40% for the other primers. On the other hand, we have demonstrated that a non-effective ART was the cause of the occurrence of a superinfection in a seroconcordant couple. All of these results emphasize the importance to improve the virological monitoring of patients under ART and to access the availability of third-line regimens. The findings suggest also the need for an alternative method for HIV-1 non-B genotyping. And, they highlight the risk of new transmission in seroconcordant couples.

Formation doctorale : Biologie et Pathologies Humaines,

Mots clés : VIH-1, résistance secondaire, ISAARV, aspects épidémiologiques, techniques de génotypage

Ecole doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement (ED-SEV)

RESUME

Auteur : Moussa THIAM

Résumé

L'Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux (ISAARV) a été lancée depuis 1998 et les patients sont suivis soit à travers des cohortes observationnelles comme celle du projet ANRS 1215, soit selon l'approche santé publique de l'OMS. L'émergence de virus résistants sous pression médicamenteuse est inévitable suite à la sélection de mutations au niveau des gènes cibles des ARVs. La détection de ces mutations de résistance peut être difficile, liée à la diversité des souches de VIH-1 et pose ainsi le problème d'une technique d'étude appropriée. Entre autre, la survenue de surinfections est une des conséquences liée à un traitement ARV non efficace et à long terme. Nos travaux scientifiques ont donné des résultats concluant. Les données obtenues de l'ANRS 1215 ont démontré un succès virologique de 89% chez les patients en 1^{ère} ligne. Cependant, l'échec virologique durant la mise sous ARV de 2nd ligne apparaît très tôt après le changement de ligne. L'étude transversale réalisée chez des patients suivis selon l'approche de santé publique, a montré qu'un nombre élevé (76,39%) de patients a développé au moins une mutation de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 40 mois. Parmi les mutations associées à une résistance aux INTIs, nous avons trouvé une prédominance des TAMs (50,79%) suivis de la mutation M184V/I (34,92%) et une prédominance du K103N (46,27%) pour les INNTIs. L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 au Sénégal a été confirmée avec une prédominance du CRF02_AG (59,72%). L'étude des performances du ViroSeq montre un taux d'amplification et de séquençage qui sont respectivement de 98% et de 96,60%. L'analyse des performances pour les amores de séquençage a montré 100% de succès pour l'amorce B alors que le taux d'échec variait entre 1,40 à 71,40% pour les autres amores. Par ailleurs, un traitement ARV non efficace a été à l'origine de la survenue d'une surinfection chez un couple séroconcordant. L'ensemble de ces résultats pose le problème d'une prévalence élevée de résistances aux ARV et une accumulation des mutations de résistance d'où la nécessité impérieuse d'améliorer le monitoring virologique des patients sous ARV et de disposer d'un schéma thérapeutique de 3^{ième} ligne. Ils montrent aussi la nécessité de disposer de techniques alternatives pour le génotypage des VIH-1 sous type non-B. Enfin, ils mettent l'accent sur le risque de nouvelles transmissions dans les couples séroconcordants.

HIV-1 ACQUIRED DRUG RESISTANCE AMONG PATIENTS OF ISAARV: EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS AND GENOTYPING TECHNIQUES

Summary

Since 1998, a national antiretroviral treatment (ART) program has been launched in Senegal and the patients are followed by an observational cohort study like the ANRS 1215 cohort or by the WHO guidelines. The emergence of HIV-1 drug resistance is inevitable due to the mutations in the protease and reverse transcriptase *pol* gene. The detection of those resistance mutations could be difficult due to the HIV-1 genetic diversity and compromises the uses of an appropriate genotyping technique. Otherwise, the occurrence of HIV-1 superinfection is one among the consequences of a long-term use of an ineffective ART. Our different studies gave interesting results. Data from the ANRS 1215 cohort showed that 89% of patients have achieved a virological success. However, the virological failure while receiving second-line regimens occurred early on after switching. The cross-sectional study among patients in the public health system showed a high number of patients (76,39%) with at least one drug resistance mutation after 40 months of median follow-up. For NRTI mutations, we had a high rate of TAMs (50,79%) followed by the M184V/I (34,92%). The K103N (46,27%) was predominant among the NNRTI mutations. The HIV-1 genetic diversity in Senegal was confirmed by the predominance of the CRF02_AG (59,72%). The study on the performance of the ViroSeq showed that the amplification and sequencing rate were respectively 98% and 96,60%. The primer performances were 100% for the primer B, while the failure rate ranged from 1,40% to 71,40% for the other primers. On the other hand, we have demonstrated that a non-effective ART was the cause of the occurrence of a superinfection in a seroconcordant couple. All of these results emphasize the importance to improve the virological monitoring of patients under ART and to access the availability of third-line regimens. The findings suggest also the need for an alternative method for HIV-1 non-B genotyping. And, they highlight the risk of new transmission in seroconcordant couples.

Formation doctorale : Biologie et Pathologies Humaines,

Mots clés : VIH-1, résistance secondaire, ISAARV, aspects épidémiologiques, techniques de génotypage

Ecole doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement (ED-SEV)
