

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>aa</b>	acide aminé
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>ANRS</b>	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et des hépatites virales
<b>APOBEC3</b>	Apolipoprotein Beta mRNA-editing enzyme Catalytic polypeptide 1-like editing complex 3
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messager
<b>ARN<sub>t3</sub><sup>Lys</sup></b>	ARN de transfert de la lysine
<b>ART</b>	Antiretroviral Therapy
<b>ARV</b>	Antirétroviral
<b>CCR5</b>	CC chemokine Receptor type 5 ; récepteur de chimiokines 5
<b>CD4</b>	Cluster of differentiation 4 ; protéine de differentiation 4
<b>CD8</b>	Cluster of differentiation 8; protéine de differentiation 8
<b>CDC</b>	Center of Disease Control, centre de surveillance des maladies
<b>CHU</b>	Centre Hospitalo-Universitaire
<b>CI</b>	Concentration Inhibitrice
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'Histocompatibilité
<b>CPN</b>	Consultation prénatale
<b>CTA</b>	Centre de Traitement Ambulatoire
<b>CNLS</b>	Comité National de Lutte contre le SIDA
<b>coll.</b>	Collaborateurs
<b>CRF</b>	Circulating Recombinant Form
<b>CV</b>	Charge Virale
<b>CXCR4</b>	CXC chemokine receptor type 4 ; récepteur de chimiokines 4
<b>DBS</b>	Dried Blood Spot ; spot de sang séché
<b>DCI</b>	Dénomination Commune Internationale
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-Integrin
<b>DIS</b>	Dimerization Signal, Signal de dimérisation
<b>dNTP</b>	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
<b>ddNTP</b>	2', 3'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
<b>DTS</b>	Dried Tube Spot, spécimen d'échantillon séché sur tube
<b>EDS</b>	Enquêtes Démographiques et de Santé
<b>EDS+</b>	Enquêtes Démographiques et de Santé combiné au test VIH
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>env</b>	Enveloppe
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>gag</b>	Group-specific antigen, gènes des antigènes de group codant pour la matrice, la capsid et la nucléocapsid

<b>gp</b>	Glycoprotéine
<b>Gp120SU ou Gp120</b>	Glycoprotéine de surface de 120 kDa
<b>Gp41TM ou Gp41</b>	Glycoprotéine transmembranaire 41 kDa
<b>HAART</b>	Highly active antiretroviral therapy
<b>HIV/VIH</b>	Human Immunodeficiency Virus/ Virus de l'Immunodéficience Simienne
<b>HIV-1/VIH-2</b>	Human Immunodeficiency Virus type 1 ; Virus de l'immunodéficience
	Humaine de type 1
<b>HIV-2/VIH-2</b>	Human Immunodeficiency Virus type 2 ; Virus de l'Immunodéficience
	Humaine de type 2
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HMA</b>	Heteroduplex Mobility Assay
<b>HR1/HR2</b>	Heptad Repeat Region 1/2
<b>HSH</b>	Hommes ayant des relations Sexuelles avec d'autres Hommes
<b>HTA</b>	Heteroduplex Tracking Assay
<b>HTLV-1</b>	Human T-lymphotropic Virus 1
<b>IAS</b>	International AIDS Society
<b>INNTI</b>	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
<b>INTI</b>	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
<b>IP</b>	Inhibiteurs de Protéase
<b>INRSP</b>	Institut National de Recherches en Santé Publique
<b>ISAARV</b>	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAV</b>	Lymphadenopathy Associated Virus
<b>LBV</b>	Laboratoire de Bactériologie-Virologie
<b>LT CD4</b>	Lymphocyte T CD4
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>MHA</b>	Multi-region Hybridization Assay
<b>ml</b>	Millilitre
<b>µl</b>	Microlitre
<b>MSM</b>	Men who have Sex with Men
<b>NC</b>	Nucléocapside
<b>nef</b>	Negative expression factor ; facteur d'expression négative codant la protéine Nef
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONUSIDA</b>	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
<b>P17 MA ou MA</b>	Protéine de matrice de 17kDa
<b>P24 CA ou CA</b>	Protéine de capsid de 24kDa
<b>P31 IN ou IN</b>	Protéine intégrase de 31kDa
<b>PBS</b>	Primer Binding Site, site de liaison de l'amorce ARN <sub>t</sub> <sup>Lys</sup>
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PIC</b>	Pre-Integration Complex

<b>pol</b>	Polymerase
<b>polyA</b>	Polyadenylation signal, signal de polyadénylation
<b>PPT</b>	Polypurine Tract
<b>PR</b>	Protéase
<b>Pr160Gag-Pol</b>	Polyprotéine Gag -Pol
<b>Pr55<sup>Gag</sup></b>	Polyprotéine Gag
<b>PS</b>	Professionnel(le)s du Sexe
<b>QIG</b>	Quotient d’Inhibition Génotypique
<b>RARS</b>	Réseau Africain de Recherche sur le SIDA
<b>rev</b>	regulator of expression virus ; gène régulateur de l’expression des virus codant la protéine Rev
<b>RNase H</b>	Ribonucléase H ; enzyme de dégradation de l’ARN
<b>RPR</b>	Rapid Plasma Reagin
<b>RRE</b>	Rev Responsive Element; site de liaison de la protéine Rev sur l’ARN viral
<b>SENLS</b>	Secrétariat Exécutif National de Lutte contre le SIDA
<b>SD</b>	Splice Donor
<b>SDRM</b>	Surveillance of Drug Resistance Mutations ; surveillance des mutations de résistance
<b>SGA</b>	Single Genom Amplification
<b>SGS</b>	Single Genom Sequencing
<b>SIDA</b>	Syndrome d’Immuno Déficience Acquise
<b>SIV</b>	Simian Immunodeficiency Virus ; virus de l’immunodéficience simienne
<b>SIVcpz</b>	Simian Immunodeficiency Virus of Chimpanzee ; virus de l’immunodéficience simienne du chimpanzé
<b>SIVgor</b>	Simian Immunodeficiency Virus of gorilla, virus de l’immunodéficience simienne du gorille
<b>SIVsmm</b>	Simian Immunodeficiency Virus of Sooty Mangebey ; virus de l’immunodéficience simienne du Mangebey enfumé
<b>SP1</b>	Specificity protein 1
<b>SU</b>	Sous Unité
<b>TAM</b>	Thymidine Analog Mutations, mutations associées aux analogues de la thymidine
<b>TAR</b>	trans-activation responsive region ; région de transactivation de TAT
<i>tat</i>	trans-activator of transcription ; gène transactivateur de la transcription codant la protéine Tat
<b>TI</b>	Transcriptase Inverse
<b>TM</b>	Transmembranaire
<b>TPHA</b>	Treponema Pallidum Heamagglutination Assay
<b>UNAIDS</b>	United Nations Programme on HIV/AIDS
<b>URF</b>	Unique Recombinant Form
<i>vif</i>	virion infectivity factor ; facteur d’infectivité viral codant pour la protéine Vif
<i>vpr</i>	viral protein R, gène codant la protéine virale R
<i>vpu</i>	viral protein U, gène codant la protéine virale U
<i>vpx</i>	viral protein X, gène codant la protéine virale X

## **LISTE DES ACIDES AMINES**

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

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Arbre illustrant la proximité phylogénétique entre les séquences des : VIH-1 groupes M et N, SIVcpz, VIH-1 groupes O et P et SIVgor.....	11
<b>Figure 2</b> : Arbre illustrant la proximité phylogénétique entre le SIVsmm du Sooty mangabey (Cercocebus atys) et les souches de VIH-2.....	12
<b>Figure 3</b> : Structure du VIH.....	18
<b>Figure 4</b> : Schéma de l'organisation génomique du VIH-1.....	20
<b>Figure 5</b> : Schéma du LTR 5' du provirus, indiquant la position des sites de liaison de certains facteurs cellulaires .....	21
<b>Figure 6</b> : Schéma du leader RNA du provirus ; .....	21
<b>Figure 7</b> : Organisation du gène gag et production des particules virales.....	25
<b>Figure 8</b> : Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 : en vert, un inhibiteur de protéase (le saquinavir) lié au site actif de l'enzyme.....	26
<b>Figure 9</b> : Schéma de la transcriptase inverse (dans un complexe avec un acide nucléique) avec ces deux sous unités (p66 et p51) et leurs sous domaines. ....	27
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de l'intégrase du VIH.....	28
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique du précurseur gp160.....	29
<b>Figure 12</b> : Modèles de dégradation de APOBEC3G induite par la protéine Vif .....	33
<b>Figure 13</b> : différentes phases de l'entrée du VIH dans la cellule hôte. ....	38
<b>Figure 14</b> : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral.....	40
<b>Figure 15</b> : Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réPLICATION du virus.....	42
<b>Figure 16</b> : Cycle de réPLICATION du VIH-1.....	45
<b>Figure 17</b> : Dispositif et résultats de prélèvement salivaire .....	47
<b>Figure 18</b> : Principe de l'ELISA Sandwich.....	52
<b>Figure 19</b> : Résultats d'un Western Blot VIH-1.....	54
<b>Figure 20</b> : Cinétiques des marqueurs viraux de la primo-infection due au VIH-1 en absence d'un traitement antirétroviral.....	55
<b>Figure 21</b> : Processus de recombinaison virale .....	60
<b>Figure 22</b> : distribution géographique mondiale des formes génétiques du VIH-1.....	67
<b>Figure 23</b> : Cibles des molécules antirétrovirales .....	89

<b>Figure 24</b> : Sélection de variants résistants sous la pression d'un traitement ARV non suppressif .....	101
<b>Figure 25</b> : Structure de l'intégrase montrant les positions de mutations majeures conférant la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase .....	106
<b>Figure 26</b> : Modèle structural représentant la TI du VIH-1 cristallisée avec un INTI et les mutations de résistance aux INNTI. ....	107
<b>Figure 27</b> : Modèle structural de la TI du VIH-1 cristallisée avec la Névirapine (boules jaunes) et les mutations de résistance aux INNTI. ....	110
<b>Figure 28</b> : Modèle structural des deux sous-unités de la protéase du VIH-1.....	113
<b>Figure 29</b> : Pourcentages de résistance associées aux inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase (A) et aux inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase (B). .....	149
<b>Figure 30</b> : Arbre Neighbor Joining construit à partir des 55 séquences pol (protéase et RT partielle) montrant la variabilité et la relation phylogénétique entre les souches de l'étude. ....	151

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Caractéristiques des différents types et groupes du VIH :.....	63
<b>Tableau II</b> : Liste des ARV approuvés par la FDA et commercialisés en 2013. ....	95
<b>Tableau III</b> : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'entrée.....	102
<b>Tableau IV</b> : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase.....	102
<b>Tableau V</b> : Mutations associées à la résistance aux INTI et aux INNTI.....	103
<b>Tableau VI</b> : Mutations associées à la résistance aux IP .....	104
<b>Tableau VII</b> : Prévalence du VIH chez les femmes en CPN au niveau des sites sentinelles entre 2001 et 2007 .....	134
<b>Tableau VIII</b> : Statut serologique (VIH) selon l'age, le statut matrimonial et niveau d'instruction. ....	141
<b>Tableau IX</b> : Résultats de charges virales, différences et quantification des variants non B en fonction des 4 plateformes.....	168

## **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : Rappels bibliographiques</b>	
<b>Chapitre I : Définition et classification, origines et épidémiologie du VIH .....</b>	<b>6</b>
<b>I.1 Définition et classification .....</b>	<b>6</b>
<b>I.2 Origine des VIH.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Origine du VIH-1 .....	9
1.2.2 Origine du VIH-2.....	11
<b>I.3 Epidémiologie du VIH.....</b>	<b>13</b>
I.3.1 Différentes méthodes de surveillance épidémiologique du VIH.....	13
I.3.1.1 Surveillance biologique.....	13
I.3.1.1.1 Sérosurveillance sentinelle dans des sous populations définies .....	13
I. 3.1.1.2 Enquêtes sérologiques dans la population générale .....	13
I. 3.1.1.3 Autres types de surveillance biologique .....	14
I. 3.1.2 Surveillance comportementale .....	14
I. 3.1.2.1 Enquêtes transversales dans la population générale .....	14
I.3.1.2.2 Enquêtes transversales dans des sous populations spécifiques .....	14
I.3.1.3 Surveillance de seconde génération ou SSG .....	15
I.3.1.4 Autres sources importantes pour la surveillance épidémiologiques du VIH.....	16
I.3.2 Situation et dynamique de l'infection par le VIH/SIDA.....	16
I.3.2.1 Dans le monde et en Afrique .....	16
I.3.2.2 En Mauritanie .....	17
<b>Chapitre II : Biologie du VIH-1 .....</b>	<b>17</b>
<b>II.1 Morphologie et structure .....</b>	<b>17</b>
<b>II.2 Organisation génomique .....</b>	<b>19</b>
II.2.1 Les régions répétées terminales (LTR).....	20
II.2.2 Les gènes de structure.....	23
II.2.2.1 Le gène <i>gag</i> (gène des antigènes de groupe) .....	23
II.2.2.2 Le gène <i>pol</i> (gène codant pour les enzymes virales) .....	25
II.2.2.2.1 La protéase virale PR .....	25
II.2.2.2.2 La transcriptase inverse TI ou Reverse Transcriptase (RT) .....	26
II.2.2.2.3 L'intégrase IN .....	28
II.2.2.3 Le Gène <i>env</i> (gène codant pour les protéines de l'enveloppe .....	29
II.2.2.3.1 Glycoprotéine de surface, gp120 .....	30
II.2.2.3.2 Glycoprotéine transmembranaire gp41TM .....	30
II.2.3 Les gènes accessoires .....	31
II.2.3.1 Les gènes de régulation .....	31
II.2.3.2 Les gènes auxiliaires.....	33
<b>II.3 Tropisme et réPLICATION du VIH .....</b>	<b>36</b>
II.3.1 Tropisme .....	36
II.3.2 RéPLICATION virale du VIH .....	36
II.3.2.1 Phase précoce : attachement - entrée - décapsidation et transcription inverse - intégration de l'ADN viral à l'ADN de la cellule hôte .....	37
II.3.2.1.1 L'attachement des particules virales .....	37
II.3.2.1.2 L'entrée .....	38
II.3.2.1.3 Décapsidation et transcription inverse .....	39
II.3.2.1.4 L'intégration de l'ADN viral .....	41
II.3.2.2 Phase tardive : Transcription assemblage bourgeonnement et maturation .....	42
II.3.2.2.1 La transcription .....	42
II.3.2.2.2 L'assemblage .....	43
II.3.2.2.3 Bourgeonnement et maturation.....	44

<b>II. 4 Diagnostic et monitoring virologique de l'infection par le VIH .....</b>	<b>46</b>
<b>II.4.1 Diagnostic .....</b>	<b>46</b>
II.4.1.1 Prélèvement sanguin sur tube.....	46
II.4.1.2 Prélèvements alternatifs.....	46
II.4.1.2.1 Nature.....	46
II.4.1.2.2 Avantages et domaines d'application.....	48
II.4.1.3 Méthodes de diagnostic du VIH.....	48
II.4.1.3.1 Méthodes directes .....	48
II.4.1.3.1.1 Mise en évidence du virus.....	49
II.4.1.3.1.2 Mise en évidence du génome viral .....	49
II.4.1.3.1.3 Mise en évidence de la protéine p24 : Antigénémie p24 .....	49
II.4.1.3.2 Méthodes indirectes .....	50
II.4.1.3.2.1 Tests de dépistage.....	50
II.4.1.3.2.1.1 Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) ou tests immuno-enzymatiques. ....	50
II.4.1.3.2.1.2 Tests rapides .....	52
II.4.1.3.2.2 Tests de confirmation .....	53
<b>II.4.2 Monitoring virologique .....</b>	<b>56</b>
<b>Chapitre III : Diversité génétique du VIH-1 et ses conséquences .....</b>	<b>58</b>
<b>III.1 Diversité génétique du VIH-1.....</b>	<b>58</b>
<b>III.1.1 Origines de la variabilité génétique.....</b>	<b>58</b>
III.1.1.1 Mutations aléatoires fréquentes .....	58
III.1.1.2 Les recombinaisons génétiques.....	59
III.1.1.3 Les pressions de sélection.....	61
III.1.1.4 Origines multiples .....	61
<b>III.1.2 Diversité génétique du VIH-1 groupe M.....</b>	<b>64</b>
III.1.2.1 Sous types du VIH-1 .....	65
III.1.2.2 Formes recombinantes circulantes (CRFs).....	65
<b>III.1.3 Répartition mondiale des sous-types et CRFs du VIH-1.....</b>	<b>66</b>
III.1.3.1 Formes pures.....	66
III.1.3.2 Formes recombinantes circulantes .....	67
<b>III.2 Conséquences de la diversité génétique .....</b>	<b>70</b>
<b>III.2.1 Conséquences biologiques (tropisme cellulaire, transmission et progression de la maladie ..</b>	<b>70</b>
III.2.1.1 Tropisme cellulaire.....	71
III.2.1.2 Transmission et progression de la maladie .....	71
<b>III.2.2 Impact sur le diagnostic et le monitoring .....</b>	<b>73</b>
<b>III.2.3 Impact sur la réponse au traitement antirétroviral .....</b>	<b>74</b>
<b>III.2.4 Impact sur la recherche vaccinale .....</b>	<b>75</b>
<b>III.3 Méthodes de détermination des sous types du VIH-1 .....</b>	<b>76</b>
<b>III.3.1 Détermination du génotype par les techniques moléculaires .....</b>	<b>77</b>
<b>III.3.1.1 Séquençage et phylogénie moléculaire : éléments de base.....</b>	<b>77</b>
III.3.1.1.1 Séquençage nucléotidique .....	77
III.3.1.1.1.1 Séquençage de première génération .....	77
III.3.1.1.1.2 Nouvelles générations de techniques de séquençage ultrasensibles à haut débit ou next-generation sequencing (NGS) .....	78
III.3.1.1.2 Phylogénie moléculaire.....	81
III.3.1.1.2.1 Méthodes de reconstruction phylogénétique.....	81
III.3.1.1.2.2 Supports statistiques de calcul de la robustesse .....	83
III.3.1.1.2.3 Analyse des recombinants .....	84
III.3.1.2 Techniques génotypiques alternatives .....	85
<b>III.3.2 Détermination des sous types par sérotypage .....</b>	<b>87</b>

<b>Chapitre IV : Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux.....</b>	<b>87</b>
<b>IV.1 Différentes classes de molécules antirétrovirales.....</b>	<b>88</b>
IV.1.1 Molécules existantes .....	88
IV.1.1.1 Les inhibiteurs d'entrée et de fusion .....	90
IV.1.1.1.1 Antagonistes du co-récepteur CCR5 .....	90
IV.1.1.1.2 Inhibiteurs de fusion .....	91
IV.1.1.2 Les inhibiteurs de l'Intégrase .....	91
IV.1.1.3 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse .....	92
IV.1.1.3.1 Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la Reverse Transcriptase.....	92
IV.1.1.3.2 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse .....	93
IV.1.1.4 Les Inhibiteurs de la protéase .....	94
IV.1.2 Molécules antirétrovirales en développement .....	96
IV.1.2.1 Classes existantes (en développement) .....	96
IV.1.2.2 Nouveaux concepts thérapeutiques .....	97
IV.1.2.2.1 Les inhibiteurs d'entrée .....	97
IV.1.2.2.2 Les inhibiteurs de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire .....	98
IV.1.2.2.3 Les inhibiteurs de maturation.....	99
<b>IV.2 Résistance aux antirétroviraux .....</b>	<b>100</b>
IV.2.1 Définition.....	100
IV.2.2 Mutations associées à la résistance aux antirétroviraux .....	101
IV.2.2.1 Mutations associées aux inhibiteurs de fusion.....	104
IV.2.2.2 Mutations associées aux inhibiteurs de l'intégrase .....	105
IV.2.2.3 Mutations associées aux INTI .....	106
IV.2.2.4 Mutations associées aux INNTI .....	110
IV.2.2.5 Mutations associées aux inhibiteurs de la protéase.....	112
IV.2.3 Surveillance de la transmission de la résistance aux ARV.....	116
<b>IV.3 Méthodes d'étude de la résistance aux ARV.....</b>	<b>118</b>
IV.3.1 Les tests génotypiques.....	118
IV.3.1.1 Le séquençage nucléotidique .....	118
IV.3.1.2 Les techniques alternatives .....	120
IV.3.2 Tests phénotypiques .....	121
IV.3.2.1 Tests phénotypiques classiques .....	121
IV.3.2.2 Tests recombinants.....	122
IV.3.3 Capacité de réplication .....	123
IV.3.4 Phénotype virtuel .....	123
IV.3.5 Tests de tropisme .....	123
IV.3.6 Détermination du quotient d'inhibition génotypique (QIG) .....	124

## **DEUXIEME PARTIE : Travaux de thèse**

<b>I. Contexte .....</b>	<b>125</b>
<b>I.1 Généralités sur le pays.....</b>	<b>125</b>
<b>I.2 Système de santé et organisation des services sanitaires .....</b>	<b>126</b>
<b>I.3 Situation épidémiologique du VIH/SIDA .....</b>	<b>127</b>
<b>II. Cadre de l'étude et justificatifs.....</b>	<b>128</b>
<b>II.1 Cadre de l'étude .....</b>	<b>128</b>
<b>II.2 Justificatifs .....</b>	<b>130</b>
<b>III. Analyses des travaux</b>	
<b>III.1 Article n° 1 : Surveillance sentinelles du VIH chez les femmes enceintes en Mauritanie entre 2001 et 2007. ....</b>	<b>132</b>
III.1.1 Problématique .....	132
III.1.2 Objectif .....	133
III.1.3 Méthodologie .....	133
III.1.4 Résultats.....	133
III.1.5 Conclusion .....	138
<b>III.2 Article N° 2 : Séroprévalence VIH chez les consultants IST à Nouakchott et Nouadhibou (Mauritanie). ....</b>	<b>139</b>
III.2.1 Probématique .....	139
III.2.2 Objectif .....	140
III.2.3 Méthodologie .....	140
III.2.4 Résultats.....	140
III.2.5 Conclusion .....	145
<b>III.3 Article N°3 : Mutations de résistance aux antirétroviraux et diversité génétique chez les adultes traités pour une infection par le VIH de type 1 en Mauritanie. ....</b>	<b>146</b>
III.3.1 Probématique .....	146
III.3.2 Objectif .....	147
III.3.3 Méthodologie .....	147
III.3.4 Résultats.....	148
III.3.5 Publication .....	152
III.3.6 Conclusion .....	160
<b>III.4 Article N°4 : Quantification de la charge virale des sous types non b : comparaison de 4 techniques commerciales. ....</b>	<b>161</b>
III.4.1 Problématique .....	161
III.4.2 Objectif .....	161
III.4.3 Méthodologie .....	162
III.4.4 Résultats.....	164
III.4.5 Conclusion .....	170
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>194</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>196</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>197</b>

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les premiers cas de Syndrome de l'Immunodéficience Acquise ou SIDA ont été relatés aux Etats-Unis en 1981 par le Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta. Ils furent décrits chez de jeunes homosexuels porteurs d'affections jusqu'à présent rares, comme la pneumonie à *Pneumocystis carinii* (actuellement renommé *Pneumocystis jiroveci*) et les sarcomes de Kaposi. Des lors, une nouvelle pathologie liée à un déficit de l'immunité fut suspecté et on tire comme conclusion que ce mal inconnu se transmet par voie sexuelle. Plus tard, en 1982, on recense sur le plan mondial des contaminations accompagnées de syndromes similaires, à la fois chez des Haïtiens, des toxicomanes par voie intraveineuse et des hémophiles ayant reçu des transfusions sanguines. La contamination se ferait donc également par voie sanguine. C'est en 1983 que les soupçons vont être portés sur un agent infectieux viral présentant une activité enzymatique (transcriptase inverse) ainsi qu'un phénomène de mort des lymphocytes CD4 (**Barre-Sinoussi F et coll., 1983**). L'agent étiologique de ce syndrome fut isolé en 1983 successivement sous le nom de LAV pour Lymphadenopathy Associated Virus (**Barre Sinoussi et coll., 1983**) et HTLV III pour Human T Lymphotropic virus III (**Gallo RC et coll., 1983**).

En 1985, un 2<sup>ème</sup> virus proche mais distinct génétiquement et qui semble moins agressif pour l'organisme que son prédecesseur fut isolé et décrit en 1986 (**Barin F et coll., 1985 ; Clavel F et coll., 1986**). Ces deux virus furent dénommés VIH-1 et VIH-2.

Les deux types de VIH sont des Lentivirus appartenant à la famille des *Retrovirideae* et sous famille des Orthoretrovirinae. Grâce la transcriptase-inverse (enzyme) dont ils sont équipé, leur matériel génétique composé d'ARN (acide ribonucléique) est transcrit en ADN (acide désoxyribonucléique) qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte et se multiplie en même temps que lui (**Coffin JM et coll., 1997**).

Le VIH-1 a une large distribution planétaire contrairement au VIH-2 essentiellement trouvé en Afrique de l'Ouest, bien que des cas sporadiques aient été isolés ailleurs. Les deux types de virus sont apparentés aux *lentivirus* des primates ou SIV pour virus. Il a été montré qu'au moins 45 espèces de primates non humains sont infectées par des SIV (**Peeters M et coll., 2013**). Trois espèces de SIV (SIVcpz, SIVgor et SIVsmm) isolées respectivement chez les grands singes (chimpanzés et gorilles) de la partie occidentale de l'Afrique équatoriale et les Mangabey enfumés de l'Afrique de l'Ouest sont impliquées dans le franchissement de la barrière d'espèce et sont à l'origine des VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine).

Cependant les analyses phylogénétiques suggèrent que les gorilles auraient acquis les SIVgor à partir des Chimpanzés et que les VIH-1 des groupes M (Major), N (non M non O), O (outlier) et P proviendraient d'au moins 4 occasions de franchissement de la barrière d'espèces des virus de la lignée SIVcpz/SIVgor (**Neel C et coll., 2010 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). Le VIH-2, proviendrait quant à lui de 8 transmissions indépendantes des virus de la lignée SIVsmm qui ont donné naissance aux 8 groupes du virus : **A, B, C, D, E, F, G et H** (**Etienne L et Peeters M, 2010 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). Cependant, une nouvelle transmission de SIV serait à l'origine d'une lignée du VIH-2 étroitement liée aux souches SIVsmm impliquant un 9<sup>ème</sup> groupe différent des groupes (A à H) précédemment rapportés. (**Ayoub A et coll., 2013**).

Le VIH-1 groupe M (Main ou Major) représentant plus de 95% des souches circulant dans le monde est responsable de la pandémie actuelle (**Santos AF et Soares MA, 2010**). Il est composé de 9 sous-types (A-D, F-H, J et K) dont certains sont subdivisés en sous-sous-types ou variants (**Santoro MM et Perno CF, 2013**). Lors de la réPLICATION virale, les nombreuses mutations induites par les erreurs de la transcriptase inverse en lien avec sa faible fidélité conduisent à des phénomènes de recombinaisons entre sous-types qui donnent naissance à des virus mosaïques ou recombinants. Ces recombinants sont de deux types (URF pour « Unique Recombinant Forms » ou formes recombinantes uniques et CRF pour « Circulating Recombinant Forms » ou formes recombinantes circulantes). Contrairement aux virus recombinants uniques, les formes recombinantes circulantes jouent un rôle important dans l'épidémie mondiale du VIH. Au sein du groupe M, le sous-type B prédomine dans les pays du Nord, en particulier l'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest. Ce sous-type ne représente qu'environ 11% des infections mondiales, contrairement aux souches de VIH-1 non-B qui en représentent environ 90% (**Hemelaar et coll., 2012**). Le sous-type de VIH-1 le plus fréquent est le sous-type C, représentant environ la moitié des sous types circulants dans le monde (**Peeters M et coll., 2013**). Il est majoritaire en Asie centrale, notamment l'Inde (**Lihana RW et coll., 2012**) et en Afrique Australe et de l'Est où il peut très largement dépasser 80% des souches isolées (**Bessong PO et coll., 2013 ; Bila DC et coll., 2013**).

Selon l'ONUSIDA, en fin 2012, le nombre de personnes (adultes et enfants) vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à travers le monde est estimé à 35,3 millions [32,2 millions-38,8 millions]. L'Afrique Subsaharienne est la région la plus durement touchée par la pandémie et concentrerait 70% de l'ensemble des nouvelles infections à VIH en 2012<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>[http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_fr.pdf)(Consulté le 16/12/2013).

En Mauritanie, selon l'ONUSIDA en 2012, l'épidémie du VIH était de type concentré avec une prévalence estimée au niveau de la population générale à 0.4% [0.3% - 0.6%]<sup>2</sup>. A l'image de l'Afrique, la transmission hétérosexuelle est la principale voie dans le pays et on estime qu'autant de femmes que d'hommes sont atteints. Les données VIH chez le groupe de donneurs de sang sont les plus régulières (depuis 1987). Malgré quelques biais, elles constituaient jusqu'en 2000, les seules données permettant de suivre l'évolution de la prévalence du VIH. Chez ce groupe, la prévalence du VIH est passée de 0.88% en 2002 à 0.25% en 2011. La première enquête d'envergure a été menée dans le pays en 2001 et portait sur un échantillon de 4204 femmes enceintes. Les enseignements tirés de cette enquête ont permis en 2003, la mise en place d'un réseau national de surveillance sentinelle de périodicité biennale chez le même groupe. Depuis 2001, les données de surveillance chez les femmes enceintes en consultation prénatale ont relayées celles de donneurs de sang dans le suivi de l'épidémie et de l'estimation de la prévalence nationale<sup>3</sup>.

La surveillance uniquement basée sur la sérologie, en particulier chez les femmes en CPN ne fournit pas d'informations sur les groupes « passerelles », qui constituent un pont par lequel l'infection est transmise des groupes vulnérables à la population générale<sup>4</sup>. La surveillance combinée sérologique et comportementale a montré ses preuves quant à l'optimisation de la surveillance du VIH/SIDA. Elle permet de mieux identifier les sous groupes de populations les plus exposés et de comprendre si des taux de prévalence élevés de l'infection à VIH sont liés à des comportements jugés à haute vulnérabilité vis-à-vis du VIH<sup>5</sup>.

L'OMS recommande de renforcer la surveillance au sein des sous-populations vulnérables tels que les Professionnel(le)s du sexe, Hommes qui ont des rapports sexuels avec d'autres Hommes et les porteurs d'IST<sup>6</sup>. Pour ce qui est des IST, il existe des preuves claires que ces dernières augmentent la probabilité de transmission du VIH et plusieurs études ont démontré une forte association entre les deux types d'IST (ulcérantes et non ulcérantes) et l'infection par le VIH. Par conséquent, le contrôle des IST peut avoir le potentiel de contribuer de manière substantielle à la prévention du VIH. Ainsi les consultants pour IST constituent un groupe important à surveiller pour contrôler l'épidémie (**Wilkinson D et Rutherford G, 2001**).

<sup>2</sup> <http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/mauritania/> (Consulté le 16.12/2013).

<sup>3</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report[1].pdf) (Consulté le 14/08/2013).

<sup>4</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration_fr.pdf) (Consulté le 14/08/2013).

<sup>5</sup> <http://www.who.int/hiv/pub/surveillance/en/isbn9291732206fr.pdf> (Consulté le 17/07/2013).

<sup>6</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 18/07/2013).

Les données de prévalence doivent être basées sur l'utilisation de technologies fiables capables de détecter tous les variants du VIH car ce virus est caractérisé par une grande diversité génétique.

La nature pandémique de l'infection par le VIH a été et reste toujours à l'origine du développement d'un arsenal important de molécules antirétrovirales (ARV) (**Mehellou et De Clercq, 2010**). L'objectif du traitement antirétroviral est de transformer l'infection à VIH en une pathologie chronique, grâce à l'utilisation d'une combinaison efficace d'au moins 3 molécules antirétrovirales (**Tsibris AM et Hirsch MS, 2010**) encore appelé traitement antirétroviral hautement actif, pour « HAART ou Highly active antiretroviral therapy ». Le passage à l'échelle des traitements HAART en plus de permettre la réduction significative du nombre de décès liés au VIH/SIDA a amélioré la qualité de vie et la santé des personnes vivant avec le VIH. Néanmoins, le bénéfice clinique de ces traitements peut être compromis par l'émergence de virus porteurs de mutations de résistance (**Jordan MR, 2011**). Pour limiter l'émergence de la résistance, le monitoring virologique des patients sous HAART est systématique dans les pays développés. Par opposition, dans les pays à faibles ressources, la charge virale et le génotypage de résistance ne sont pas disponibles en routine et le suivi des patients traités est principalement basé sur le dosage des CD4 et la clinique (**Kouanfack C et coll., 2009 ; Barth RE et coll., 2010**).

Le traitement ARV a été mis en place dans le pays en début 2005 et en fin 2009, le nombre de patients recevant les ARV était de 1162 sur une cohorte de 2797 patients VIH/SIDA. Ces patients sont suivis au Centre de traitement Ambulatoire (CTA)<sup>7</sup>. A l'instar de la plupart des pays africains, seuls deux lignes de traitements y sont disponibles. Le diagnostic précoce n'est pas encore accessible dans le pays. La charge virale a été introduite en 2008 alors que le génotypage n'est pas encore disponible et aucune donnée publiée sur les mutations de résistance aux ARV n'existe encore.

L'utilisation de la charge virale pour la détection de l'échec virologique précoce et le suivi des patients sous traitement antirétroviral constitue une forte recommandation de l'OMS en 2013<sup>8</sup>. Les techniques de charge virale disponibles ont été développées à partir du sous-type B et certaines d'entre-elles présentent des défauts de quantification des sous-types non-B, en particulier le CRF02\_AG prédominant dans notre contexte (**Korenromp EL et coll., 2009**).

<sup>7</sup>[http://www.internationalhealthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country\\_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf](http://www.internationalhealthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf) (Consulté le 02/08/2013).

<sup>8</sup>[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 03/08/2013).

En Mauritanie, la seule plateforme de charge virale (technologie CAP-CTM /Roche) disponible a été mise en place sans évaluation préalable à son utilisation. Devant cette situation, une mise à jour des données de surveillance, la documentation de l'efficacité du traitement ARV et l'évaluation des plateformes de charge virale disponibles dans notre contexte, y compris celle utilisée dans le suivi des patients sous ARV en Mauritanie s'avèrent nécessaires. C'est ainsi que ce travail de thèse a été entrepris et avait eu comme objectifs de :

- Apprécier l'évolution de la prévalence et la qualité des données générées sur la période de 2001 à 2007 au niveau des sites de surveillance sentinelles des femmes en consultation prénatale,
- Mener une étude de seconde génération (sérologique et comportementale) sur le VIH chez les consultants pour infections sexuellement transmissibles (IST) à Nouakchott et à Nouadhibou (Mauritanie),
- Etudier les profils de mutations de résistance et la diversité génétique du VIH-1 chez les patients traités en Mauritanie,
- Evaluer les techniques de monitoring virologique existantes dans notre contexte (Mauritanie et Sénégal).

Pour arriver à ces objectifs, le présent document a été structuré en deux parties :

- Une première partie de revue de la littérature sur la surveillance épidémiologique et la biologie du VIH, le diagnostic et le monitoring virologique, la diversité génétique du VIH, l'épidémiologie moléculaire et les différentes techniques de génotypage du VIH, les traitements antirétroviraux, la résistance aux ARV et les différentes techniques d'étude de la résistance.
- Une deuxième partie qui traitera des différents travaux et publications scientifiques qui s'ouvriront sur des perspectives après la discussion des résultats et une conclusion générale.

## **PREMIERE PARTIE :**

# **Rappels Bibliographiques**

# **PREMIERE PARTIE : Rappels bibliographiques**

## **Chapitre I : Définition et classification, origines et épidémiologie du VIH**

### **I.1 Définition et classification**

Le VIH est classé dans le « sous-genre » des Lentivirus des Primates de la famille des Retrovirideae (ou rétrovirus) et sous famille des Orthoretrovirinae responsables de pathologies à évolution lente. Les Retroviridae sont représentés par une large famille de virus dont le matériel génétique est composé d'ARN monocaténaire. Ils sont définis par leur mode de réPLICATION qui passe par une étape de rétrotranscription de leur matériel génétique constitué de deux molécules d'ARN identiques en ADN. Cette étape obligatoire à la multiplication du virus est possible grâce à une enzyme qui entre dans la structure du virus : la Transcriptase Inverse (TI) ou Reverse Transcriptase (RT). L'ADN néoformé intégré dans le génome de la cellule hôte se comporte comme partie intégrante de ce dernier et se réplique en même temps que lui (**Coffin JM et coll., 1997**). Ainsi il est transmis aux cellules descendantes à chaque mitose.

Les Rétrovirus exogènes sont subdivisés en 7 genres, regroupés en deux sous-familles :

- Sous famille des Spumaretrovirinae composé du seul genre Spumavirus.
- Sous famille des Orthoretrovirinae subdivisée en 6 genres : Alpharetrovirus, Bétaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus et les Lentivirus (**Coffin J et coll., 2003**).

Les Rétrovirus peuvent infecter beaucoup de vertébrés parmi lesquels les bovins, les équidés, les chats, les caprins et notamment les primates. Ils sont retrouvés chez de nombreux mammifères dont les primates non humains. Ils ne provoquent pas de maladies chez leur hôte naturel, ce qui supposerait une adaptation de l'hôte au virus sur une longue période. Par contre leur passage d'une espèce à une autre, peut provoquer parfois l'immunodéficience : cas du passage du SIVsmm vers le Macaque (**Silvestri G et coll., 2005**).

Deux types de VIH sont actuellement décrits comme agents étiologiques du SIDA chez l'homme :

- le VIH-1, proche des virus SIVcpz et SIVgor infectant naturellement les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) et les gorilles (*Gorilla gorilla*) de la partie occidentale de l'Afrique Centrale (**Keele BF et coll., 2006 ; Van Heuverswyn F et coll., 2006, Plantier JC et coll., 2009 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**).
- le VIH-2 proche des virus SIVsmm retrouvés chez les mangabeys enfumés (*Cercopithecus atys*) d'Afrique de l'Ouest (**Santiago ML et coll., 2005 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**).

Les virus du VIH-1 sont classés en quatre groupes. Le groupe M ou Majeur responsable de la pandémie actuelle, le groupe O ou Outlier (divergeant), le groupe N ou non O, non M et le groupe P, récemment décrit (**Plantier JC et coll., 2009**). Les trois derniers groupes sont rares et retrouvés quasi exclusivement chez les patients originaires d'Afrique Centrale (**Simon F et coll., 1998 ; Takehisa J et coll., 2009 ; Plantier JC et coll., 2009 ; Sharp PM et coll., 2010 ; Delaugerre C et Coll., 2011 ; Vallari A et Coll., 2011**). Le Cameroun qui constitue le seul pays où les 4 groupes coexistent, présente la diversité génétique du VIH la plus grande, incluant les formes recombinantes (**Ndung'u T et Weiss RA, 2012**).

Le groupe M est subdivisé en 9 sous-types purs ou clades et 61 formes recombinantes ou CRFs.<sup>9</sup> Les 9 sous types pures du VIH-1 sont nommés : A B, C, D, F, G, H, J, K. Le sous-type A est subdivisé en 5 sous-sous-types : A1, A2 (**Gao F et coll, 2001**) A3, A4 et A5 (**Méloni ST et coll., 2004 ; Vidal N et coll., 2006 ; Vidal N et coll., 2009**). Le sous type F est lui subdivisé en 2 sous-sous types F1 et F2 (**Triques K et coll., 1999**).

Sous l'effet de l'infidélité de la TI, les recombinants résultent d'événements de recombinaisons inter-sous-types qui surviennent lors de l'étape de rétrotranscription de l'ARN dans une cellule co-infectée par au moins 2 sous types différents. En lien avec le rôle important qu'ils jouent dans l'épidémie mondiale, ces recombinants sont appelés formes recombinantes circulantes ou CRF (circulating recombinant forms). C'est le cas du recombinant CRF02\_AG, deuxième forme recombinante circulante découverte et variant prédominant en Afrique de l'Ouest, qui résulte d'une recombinaison entre les sous-types A et G (**Montavon C et coll., 2000 ; Toure-Kane C et coll., 2000, Joris Hemelaar, 2012**). A côté de ces recombinants, existent d'autres recombinants appelés formes recombinantes uniques ou URF (unique recombinant forms), isolés chez un nombre limité d'individus et qui ne présentent aucun intérêt épidémiologique.

## I.2 Origine des VIH

L'origine des VIH comme dérivant des virus de l'immunodéficience simienne (VIS ou SIV), est clairement établie. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer le passage de ces souches SIV à l'homme. Sur la base des études moléculaires et la distribution des séquences génomiques, le VIH serait passé du singe à l'Homme entre 1915 et 1941 (**Korber et coll., 2000, Lemey et coll., 2003**). Selon cette estimation, l'hypothèse (de Dr Kaprowski) d'une transmission à partir de vaccins anti-Polioavirus qui seraient contaminés par le SIVcpz, administrés à un million de personnes au Congo belge à la fin des années 50 ne tient pas (**Blancou et coll., 2001**).

---

<sup>9</sup><http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 04/12/2013).

Bien que les circonstances des transmissions inter-espèces des grands singes à l'Homme soient inconnues, l'hypothèse la plus probable pour ces transmissions reste l'exposition sanguine de l'Homme à des animaux infectés. Ces contacts sanguins, mais aussi potentiellement le contact avec d'autres sécrétions ou tissus infectés, ont pu avoir lieu lors de la chasse ou la préparation de viande de brousse, ou même lors de blessures infligées par des singes domestiqués (**Blancou et coll., 2001; Worobey M et coll., 2004 ; Van Heuverswyn et Peeters M, 2007 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). 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 VIH. En effet, il y a de forts arguments en faveur de l'existence probable d'un ancêtre commun aux Lentivirus des primates (**Gao F et coll., 1999 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**).

Le nombre de SIV identifiés a augmenté de façon constante au cours des 20 dernières années et à ce jour, il a été montré qu'au moins 45 espèces de primates non humains sont infectées par des SIV (**Bibollet-Ruche F et coll., 2004 ; Van Heuverswyn F et Peeters M 2007 ; Sharp PM et Hahn B, 2010 ; Locatelli S et Peeters M, 2012**). Ce nombre pourrait être sous-estimé, sachant que des SIV ont été retrouvés dans 90 % des espèces de singes examinées à ce jour et qu'il y a au moins 73 espèces de primates non humains en Afrique subsaharienne (**Etienne L et Peeters M, 2010**). A cela, s'ajoute le fait que l'infection à SIV n'est pas documentée au niveau des 2 continents asiatique et sud-américain où il n'est pas encore menées de grandes enquêtes sur les espèces sauvages de primates non humains (**Locatelli S et Peeters M, 2012**). Cependant, seuls 3 primates non humains sont reconnus comme étant impliqués dans le franchissement de la barrière d'espèce. Il s'agit des chimpanzés et gorilles de la partie occidentale de l'Afrique centrale qui hébergent des SIV de la lignée SIVcpz/SIVgor proches des VIH-1 et des mangabeys enfumés de l'Afrique de l'Ouest avec la lignée SIVsmm (**Peeters M et coll., 2008**).

Généralement chez son hôte naturel, le SIV ne provoque ni déplétion de cellules TCD4+, ni SIDA, même en présence de charges virales élevées. En revanche, sa transmission à une autre espèce, engendre une perte progressive des TCD4+ et une forte prédisposition aux infections opportunistes, comme c'est le cas pour le macaque rhésus (*Mucaca mulatta*) et l'Homme, (**Hahn et coll., 2000 ; Silvestri G et coll., 2005 ; Li B et coll., 2010**). Cependant, il a été décrit chez un Chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (Cam155/Ch-Go) naturellement infecté par un SIV (SIVcpz), une évolution de la charge virale et des observations cliniques associées à une déplétion des CD4. Cet état était accompagné de plusieurs épisodes d'infection par divers agents pathogènes, suggérant une infection à SIV progressive, semblable à l'infection par le VIH chez l'homme qui confirme que SIVcpz peut parfois être pathogène chez son hôte naturel (**Etienne L et coll., 2011**).

### **1.2.1 Origine du VIH-1**

Les premiers arguments relatifs à l'origine du VIH-1 ont été émis en 1989. Ils sont basés sur les premières souches de SIVcpz isolées au Gabon chez deux chimpanzés captifs nés dans la nature, SIVcpz GAB1 et GAB2. L'analyse du génome du SIVcpzGab1 révéla la présence du gène accessoire *vpu*, semblable à celui du génome du VIH-1. Par ailleurs, son analyse phylogénétique a montré qu'il était apparenté au VIH-1 et non aux SIV connus à l'époque (**Peeters M et coll., 1989**). Toutes les souches de SIVcpz isolées par la suite, de même que les souches du Gabon provenaient des chimpanzés de la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes* (*Ptt*), à l'exception de celle de SIVcpzANT, isolée chez un chimpanzé *Pan troglodytes schweinfurthii* (*Pts*) qui montre une grande divergence vis-à-vis des autres souches de SIVcpz (**Peeters M et coll., 1992 ; Gürtler LG et coll., 1994 ; Vanden Haesevelde MM et coll., 1996**). Cette observation suggéra qu'il existait deux lignées SIVcpz spécifiques de leurs sous-espèces d'origine. D'autre part, toutes les souches VIH-1 s'avéraient plus proches du SIVcpzPtt que du SIVcpzPts (**Gao F et coll., 1999**).

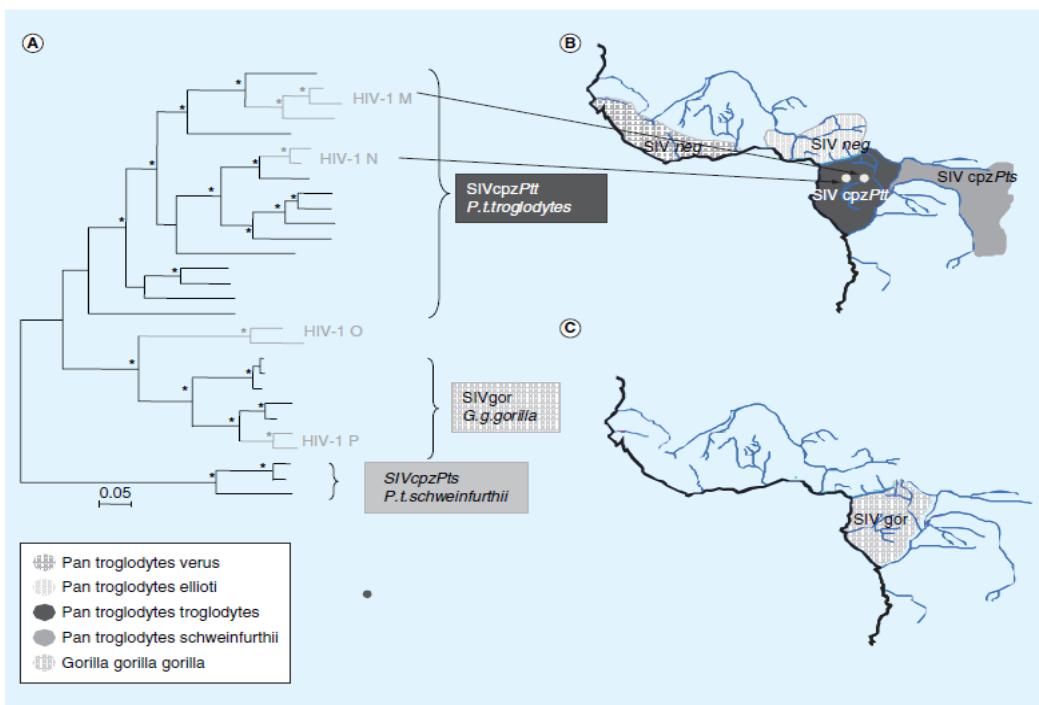
Des études portant sur un grand nombre de chimpanzés vivant dans la nature ont permis la mise en évidence du réservoir de façon définitive. Basées sur des techniques non invasives, elles ont permis la détection et la caractérisation de SIVcpz dans les « fèces ». Ces études ont prouvé, en étudiant des chimpanzés vivant en Tanzanie et en République Démocratique du Congo, appartenant à la sous-espèce *Pan troglodytes schweinfurthii* (*Pts*), que le SIVcpzPts proche du SIVcpzANT, forment une lignée bien séparée, confirmant que cette dernière n'est pas à l'origine du VIH-1 (**Santiago ML et coll., 2003 ; Worobey M et coll., 2004 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). Des travaux d'identification des souches de SIVcpzPtt sur la totalité de leur génome menés dans différentes communautés de chimpanzés de la partie ouest de l'Afrique Centrale, ont montré une grande similitude entre les génomes des VIH-1 des groupes M et N (**Keele BF et coll., 2006 ; Van Heuverswyn F et coll., 2006**).

Le VIH-1 groupe O, quand à lui a été retrouvé très proche des SIVgor infectant les gorilles (**Van Heuverswyn F et coll., 2006 ; Takehisa et coll., 2009 ; Neel C et coll., 2010**). Une nouvelle souche de VIH-1 encore beaucoup plus proche du SIVgor représentant une 4<sup>ème</sup> lignée baptisée groupe P a été mise en évidence en 2009 (**Plantier JC et coll., 2009**). Les analyses phylogénétiques laissent suggérer que les gorilles auraient été infectés à partir du chimpanzé. Ceci laisse supposer que les VIH-1 proviendraient d'une seule et unique lignée de SIVcpz/SIVgor mais par l'intermédiaire d'au moins 4 transmissions indépendantes des virus de cette lignée donnant ainsi les 4 groupes M, N, O et P (**Neel C et coll., 2010 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**).

En effet, les relations phylogénétiques entre SIVcpz, SIVgor et VIH-1 indiquent que les chimpanzés représentent le réservoir originel des SIV qui sont aujourd’hui présents chez les chimpanzés, les gorilles et chez l’homme (**Taylor BS et coll., 2008 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). Cependant de nombreuses questions restent encore non élucidées, en particulier la manière dont les gorilles ont été contaminés et pourquoi sur environ les 45 SIV contaminant les primates non humains (**Peeters M et Chaix ML, 2013 ; Locatelli S et Peeters M, 2012**) très peu d’entre-eux sont transmissibles à l’Homme (**Bieniasz PD, 2012**).

Une étude récente a montré que SIVcpz serait à l’origine un recombinant entre deux lignées de SIV de singes du vieux Monde. Ce dernier a généré son précurseur (recombinant) par une série de perte de gènes et d’événements d’adaptation. C’est ainsi que *vpx* a été supprimé par délétion génomique lors de la création de SIVcpz. Cette délétion a par la suite favorisé la reconstruction du gène *vif* par création d’un *vif* unique chevauchant à son extrémité 3’ avec le gène *vpr* et capable de contrecarrer le facteur cellulaire de l’hôte APOBEC3. La restriction du franchissement de la barrière d’espèce à l’homme a facilité l’infection humaine par SIVcpz et son adaptation ultérieure à l’origine du VIH-1 (**Etienne L et coll., 2013**).

Avec l’augmentation de la prévalence du VIH en milieu rural et la consommation de primates comme viande de brousse, la recombinaison entre SIV nouvellement introduits en circulation et les souches de VIH, peut poser un risque supplémentaire de déclenchement d’une nouvelle épidémie de VIH (**Van Heuverswyn F et Peeters M, 2007**).



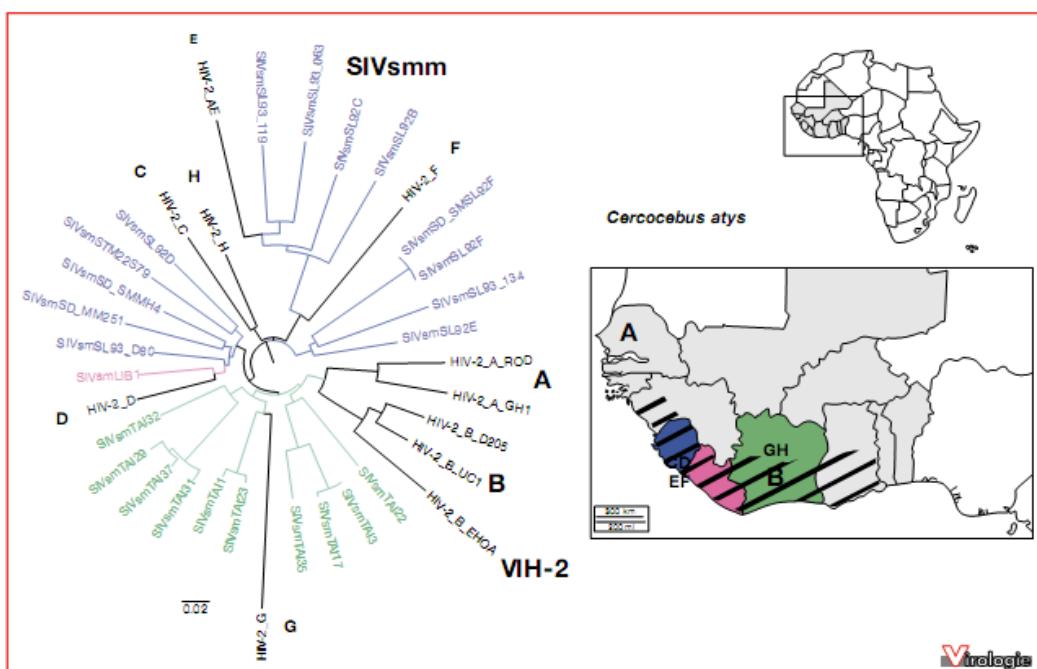
**Figure 1 : Arbre illustrant la proximité phylogénétique entre les séquences des : VIH-1 groupes M et N, SIVcpz, VIH-1 groupes O et P et SIVgor. ) (Peteers M, Jung M, Ayouba A, 2013).**

(A) Relation évolutive des SIVcpzPts infectant les chimpanzés de l'Afrique de l'Est (*Pan troglodytes schweinfurthii*), SIVcpzPtt infectant les chimpanzés d'Afrique centrale (*Pan troglodytes troglodytes*) et SIVgor infectant les gorilles des plaines occidentales de l'Afrique centrale (*Gorilla gorilla gorilla*) et les VIH-1 groupes M, N, O et P. (B) Habitat géographique des quatre sous-espèces (*Pan troglodytes* sp) de chimpanzés. Les zones géographiques des populations de chimpanzés sauvages infectés par les ancêtres des VIH-1 groupes M et N sont en cercles blancs. (C) Habitat géographique des gorilles (*Gorilla gorilla*

### I.2.2 Origine du VIH-2

Avec la découverte en 1986 du VIH-2 et la remarquable homologie qu'il partage avec le SIVsmm infectant naturellement le mangabey enfumé de l'Afrique de l'Ouest, l'hypothèse de l'origine simienne du VIH ne faisait plus de doute (Van Heuverswyn F et Peeters M, 2007 ; Etienne L et Peeters M, 2010). Au même moment, des arguments de taille, identifiant le SIVsmm comme étant l'origine du VIH-2 ont été développés. Il s'agit de similitudes d'organisation des génomes des 2 virus (présence du gène *vpx*), la correspondance entre l'habitat naturel des mangabeys enfumés et l'épicentre de l'épidémie du VIH-2 et enfin la relation de proximité qui lie ces singes à l'Homme (chasse, animal de compagnie). De nombreux éléments sont en faveur de la transmission zoonotique du SIVsmm vers l'homme. Ainsi le VIH-2 proviendrait de 8 transmissions indépendantes des virus de la lignée SIVsmm qui ont donné naissance aux 8 groupes (A, B, C, D, E, F, G et H) du virus (Diamond F et coll., 2004). Les groupes A et B contribuent à l'épidémie du VIH-2 en Afrique de l'Ouest (Van Heuverswyn F et Peeters M, 2007 ; Peeters M et Chaix ML, 2013).

Une étude menée en 2013 a identifié une nouvelle souche (07IC-TNP03) de VIH-2 distincte de tous les autres groupes du virus, isolée chez un garçon ivoirien de 8 ans. La découverte de cette 9<sup>ème</sup> souche de VIH-2 représentant le nouveau groupe du virus souligne la nécessité d'élucider les mécanismes moléculaires et facteurs biologiques associés à l'émergence de souches de SIVsmm chez les humains (**Ayouba A et coll., 2013**).



**Figure 2 : Arbre illustrant la proximité phylogénétique entre le SIVsmm du Sooty mangabey (*Cercocebus atys*) et les souches de VIH-2 (Etienne L et Peeters M, 2010).**

**A gauche** : arbre montrant la proximité entre les souches de SIVsmm et les groupes du VIH-2. (grande lettre pour une épidémie, petite lettre uniquement quelques cas caractérisés).

**A droite** : carte géographique représentant l'habitat des singes mangabey (rayures noires) et la localisation des groupes de VIH-2. Les codes couleurs pour les différents SIVsmm dans l'arbre phylogénétique et la carte sont : vert pour la Côte-d'Ivoire, rose pour le Libéria et bleu pour la Sierra Léone.

Pour contrôler la pandémie du VIH/SIDA, la connaissance des différentes méthodes de surveillance épidémiologiques basées sur des outils validés, le recueil de données de qualité et une surveillance épidémiologique adaptée à chaque contexte local sont nécessaires. Ainsi, les résultats collectés au niveau local, régional et international font l'objet de rapports épidémiologiques publiés annuellement par l'ONUSIDA.

## I.3 Epidémiologie du VIH

### I.3.1 Différentes méthodes de surveillance épidémiologique du VIH

Les méthodes de surveillance épidémiologique sont variables et leur choix dépend de l'objectif recherché et des données à recueillir (**Ghys PD et coll., 2001**).

#### I.3.1.1 Surveillance biologique

##### I.3.1.1.1 Sérosurveillance sentinelle dans des sous populations définies

La sérosurveillance sentinelle du VIH est le suivi des taux d'infection par le VIH dans les populations concernées au moyen d'établissements «sentinelles» permettant un accès à des populations qui présentent un intérêt particulier dans le cadre de l'épidémie ou qui sont représentatifs d'une population plus vaste.<sup>10</sup> Les enquêtes sont menées à des intervalles répétés (annuellement ou tous les deux ans) selon une méthodologie constante chez le même groupe pour suivre l'évolution de la prévalence et la tendance de l'épidémie. Le test VIH est réalisé selon la méthode anonyme non corrélée et le consentement de la personne n'est pas nécessaire, ce qui réduit au minimum les biais introduits par le refus du test. Les systèmes de sérosurveillance sentinelle en Afrique sont de qualité variable, mais ils produisent pour la plupart des pays des résultats fiables. Cependant, pour d'autres pays, les données ne sont pas toujours fiables et ne permettent donc pas une bonne estimation de la prévalence ni une bonne mesure du fardeau lié à la maladie (**Walker N et coll., 2001**).

Les activités de sérosurveillance sont généralement centrées sur les femmes de 15 à 49 ans, fréquentant les centres offrant des soins prénatals (**Bozicevic I et coll., 2013 ; Frickmann H et coll., 2013**), avec un accent particulier sur les femmes âgées de 15 à 24 ans pour estimer la prévalence des infections récentes.<sup>10</sup>

##### I. 3.1.1.2 Enquêtes sérologiques dans la population générale

Il s'agit d'une sérosurveillance menée au sein de la population générale permettant l'estimation de l'infection à VIH/SIDA au niveau d'un pays ou d'une région donnée. Les participants sont choisis au hasard selon un plan d'échantillonnage basé sur les ménages. Ce type d'enquête est fiable et représentatif de la population dans son ensemble. On fait généralement recours à des méthodes non invasives (prélèvement de sang total au bout du doigt) et l'obtention du consentement éclairé des sujets enquêtés est obligatoire (**Mishra V et coll., 2006**). De ce fait, on peut s'attendre à de taux élevés de refus de participation, constituant ainsi un biais.

---

<sup>10</sup>[http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 18/06/2013).

Par ailleurs, ces enquêtes sont onéreuses car mobilisent beaucoup de ressources humaines et financières. Pour toutes ses raisons, l'OMS et l'ONUSIDA, ne conseillent leur réalisation que tous les 4 ans.<sup>11</sup>

#### **I. 3.1.1.3 Autres types de surveillance biologique**

D'autres types de méthodes biologiques sont utilisés dans la surveillance du VIH, notamment : **i)** dépistage régulier du VIH dans les dons de sang, **ii)** dépistage régulier au sein des cohortes professionnelles (militaires, policiers...) ou d'autres sous-populations, **iii)** enquêtes transversales chez des populations à risque d'infection par le VIH, **iv)** dépistage dans des échantillons prélevés lors d'enquêtes sur la population générale ou sur des populations spéciales.

#### **I. 3.1.2 Surveillance comportementale**

Le but de ce système de surveillance est de mesurer la connaissance générale de la population sur le VIH/SIDA et les méthodes de prévention. On peut citer deux grands types d'enquêtes comportementales :

##### **I. 3.1.2.1 Enquêtes transversales dans la population générale**

Elles concernent un échantillon représentatif de la population générale d'un pays ou région donnée, c'est le cas des Enquêtes Démographiques et de Santé (EDS). Les données recueillies concernent les connaissances, attitudes et pratiques, notamment sexuelles.

Elles sont obtenues le plus souvent par le biais d'un questionnaire administré par un enquêteur (administration directe) ou par auto-administration. Ce type d'enquête est sans conteste celui qui permet d'apprécier le mieux et avec finesse, les modifications de l'exposition aux risques au cours du temps.

##### **I.3.1.2.2 Enquêtes transversales dans des sous populations spécifiques**

Il s'agit d'enquêtes comportementales menées dans des groupes de populations présentant un risque supérieur d'infection par le VIH comparés à la population générale. Selon le contexte local, il peut s'agir de professionnel(le)s du sexe et leur clientèle, les HSH (Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes) également appelés MSM (Men who Have Sex with Men), les consommateurs de drogues injectables, etc.

---

<sup>11</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration_fr.pdf) (Consulté le 20/06/2013).

Du fait de leur difficulté d'accès, une approche particulière consistant à l'utilisation de leaders de groupes parmi la cible à enquêter comme facilitateurs est recommandée : on parle de méthode boule de neige.

### I.3.1.3 Surveillance de seconde génération ou SSG

Ce type d'enquête a été recommandé par l'OMS et l'ONUSIDA, suite aux leçons apprises de plusieurs années d'expérience sur la surveillance sentinelle. Il s'agit d'un système renforcé de surveillance qui repose à la fois sur la biologie (test) et les comportements qui propagent l'épidémie permettant une compréhension globale et complète (ampleur et dynamique) de l'épidémie au sein d'un pays ou région donnée au cours du temps, d'où son avantage. Les enquêtes sont menées à intervalles de temps régulier (généralement tous les 4 ans).<sup>12</sup> La SSG s'intéresse aussi bien à la population générale, aux populations vulnérables au VIH, qu'aux populations passerelles. Elle se base sur le niveau d'épidémie du terrain d'étude (**Walker N et coll., 2001**) et sur la répartition de l'infection au sein des deux zones urbaine et rurale. C'est ainsi que les épidémies à VIH ont été classées en 3 types par l'OMS<sup>13</sup> :

#### Epidémie peu active :

La prévalence est inférieure à 5% de manière constante chez une quelconque sous-population donnée. La majorité des cas d'infection sont recensés chez les individus ayant un comportement qui expose à l'infection par le VIH. Les efforts de surveillance dans ce cas doivent se concentrer sur les sous populations vulnérables.

#### Epidémie concentrée :

La prévalence a constamment été de plus 5% chez au moins une sous-population donnée et de moins de 1% chez les femmes enceintes des zones urbaines (cas de la Mauritanie). Pour ce type d'épidémie, à côté de la surveillance au sein de la population générale, doit être renforcée la surveillance au sein des sous-populations vulnérables : porteurs d'IST, Professionnel(le)s du sexe, hommes qui ont des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH).

---

<sup>12</sup> <http://www.who.int/hiv/pub/surveillance/en/isbn9291732206fr.pdf> (Consulté le 21/06/2013).

<sup>13</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconducton\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconducton_fr.pdf) (Consulté le 21/06/2013).

## **Epidémie généralisée :**

La prévalence a constamment été de plus de 1% chez la population générale. Dans les pays à épidémie généralisée, la surveillance du VIH doit porter simultanément sur la population générale et les populations vulnérables.

### **I.3.1.4 Autres sources importantes pour la surveillance épidémiologiques du VIH**

**i)** surveillance des cas d'infection par le VIH, des cas de SIDA, **ii)** registre de décès, **iii)** surveillance des IST, surveillance de la tuberculose.

Dans les pays du Sud, vu la faiblesse des ressources, il y a nécessité de simplifier les efforts de surveillance et de minimiser leurs coûts. C'est ainsi que depuis 2001 a été introduit aux enquêtes démographiques et de santé (EDS), notamment en Afrique, un module de dépistage du VIH, on parle d'EDS+. Réalisées généralement tous les cinq ans afin de pouvoir suivre les évolutions de la population, elles sont conduites auprès des ménages par milieu de résidence et par région et sont représentatives au niveau national.<sup>14</sup>

Une autre réponse au souci de simplifier les efforts de surveillance pourrait être apportée par le développement d'un test rapide performant capable de détecter sur une même bandelette, les deux types d'infections (récente et ancienne), fournissant simultanément des informations sur la prévalence et l'incidence du VIH (**Granade TC et coll., 2013**).

## **I.3.2 Situation et dynamique de l'infection par le VIH/SIDA**

### **I.3.2.1 Dans le monde et en Afrique**

Selon l'ONUSIDA, en fin 2012, le nombre de personnes (adultes et enfants) vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à travers le monde est estimé à 35,3 millions [32,2 millions-38,8 millions]. L'Afrique Subsaharienne en représente 25 millions [22,1 millions-24,8 millions]. Cette région d'Afrique concentrerait 70% de l'ensemble des nouvelles infections à VIH en 2012. Le nombre mondial des personnes nouvellement infectées s'estimait à 2,3 millions [1,9 millions-2,7 millions] en 2012 et le mode de contamination était essentiellement sexuel. Pour ce qui est des décès, dans le monde 1,6 million [1,4-1,9 million] sont morts du SIDA en 2012. En Afrique sub-saharienne, le nombre de nouvelles infections (1,6 million [1,4-1,8 millions]) en 2012 a diminué de 34% depuis 2001 alors que les décès liés au SIDA estimés à 1,2 millions [1,4-1,8 millions] ont connu une diminution importante entre 2005 et 2012.

---

<sup>14</sup>[http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/demo/documents/Larmarange\\_et\\_al\\_light.pdf](http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/demo/documents/Larmarange_et_al_light.pdf) (Consulté le 26/10/2013).

Malgré ces progrès considérables, l’Afrique sub-saharienne reste la région la plus durement touchée par la pandémie, ce qui souligne l’importance de renforcer davantage les efforts de prévention et de prise en charge.<sup>15</sup>

### I.3.2.2 En Mauritanie

L’épidémie du VIH/SIDA en Mauritanie reste peu documentée et Selon l’ONUSIDA en 2012, elle est définie de type concentré avec une prévalence estimée au niveau de la population générale à 0.4% [0.3% - 0.6%].<sup>16</sup> La prévalence chez les femmes en consultation prénatale régulièrement inférieure de 1% était respectivement de 0.62% et 0.48% en 2007 et 2009. En 2008, les prévalences observées chez 2 groupes vulnérables étaient plus importantes et étaient respectivement de 3.9% et 7.4% chez les tuberculeux et les Professionnelles du sexe.

## Chapitre II : Biologie du VIH-1

Le VIH-1 a été isolé en 1981 et décrit en 1983 par l’équipe française de Luc Montagnier (**Barré-Sinoussi F et coll., 1983**). Même si son organisation moléculaire est assez bien connue, il reste beaucoup à élucider sur les fonctions de ses différents gènes et leurs interactions avec les composants de la cellule hôte.

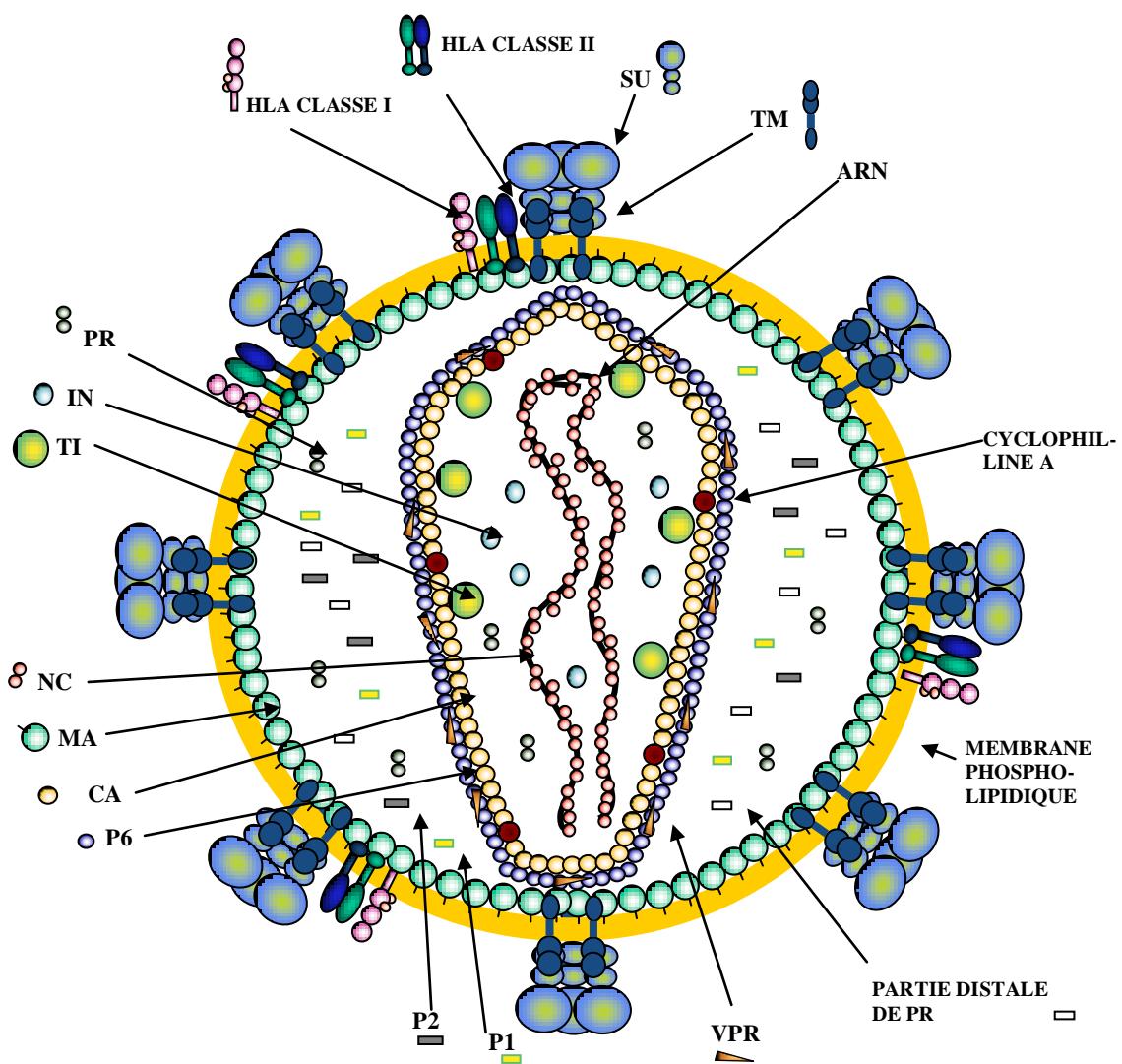
### II.1 Morphologie et structure

Au microscope électronique, les virus VIH-1 et VIH-2 matures, se présentent sous forme de particules sphériques de 80 à 120 nm qui sont produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées.

---

<sup>15</sup> [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_fr.pdf) (Consulté le 16/12/2013).

<sup>16</sup> <http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/mauritania/> (Consulté le 09/12/2013).



**Figure 3 : Structure du VIH (Coffin JM et coll., 1997).**

Le virus est constitué de :

#### - L'enveloppe virale

Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique et de deux sortes de glycoprotéines : la gp120SU et gp 41TM. La molécule gp 41 traverse la bicouche lipidique tandis que la molécule gp120 occupe une position plus périphérique. La gp120 joue le rôle de récepteur viral de la molécule membranaire CD4 des cellules hôtes. L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte et contient ainsi des protéines membranaires de cette dernière parmi lesquelles les antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), l'actine et l'ibiquitine (**Arthur LO et coll., 1992**). Pour le VIH-2, les équivalents respectifs des glycoprotéines gp120 et gp 41 sont la gp125 et de la gp36.

### - La matrice

Collée à l'enveloppe, elle se compose d'environ 2000 copies de la protéine p17 MA codée par le gène *gag*. Elle est liée à la surface interne de l'enveloppe par l'intermédiaire d'un acide myristique et stabilise la structure du virus. Elle sépare physiquement l'enveloppe de la capsid virale.

### - La capsid

De symétrie conique, elle est localisée au centre de la particule du virus et protège l'ARN viral. Elle est constituée d'environ 2000 copies de la protéine p24 CA codée par le gène *gag*. Elle est constituée de :

- la nucléocapsid ou core, constituée principalement de 2000 molécules de la protéine basique p7 NC, enveloppant le génome pour former un complexe ribonucléoprotéique.
- trois enzymes : la protéase PR, la transcriptase inverse RT et l'intégrase IN.
- le génome constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin, linéaire, de polarité positive et d'environ 9,2 Kb.

D'autres éléments comme la protéine p6, nécessaire au passage du génome viral dans le noyau de la cellule infectée et la protéase PR qui permet la maturation de la particule virale après son bourgeonnement, sont également présents dans la particule virale (**Turner BG et Summers MF, 1999**).

## II.2 Organisation génomique

Les génomes du VIH-1 et VIH-2 partagent entre eux, globalement une homologie d'environ 60% pour les gènes les plus conservées (*gag* et *pol*) et entre 30 à 40% pour les autres gènes, y compris *env* et les LTRs (**Guyader M et coll., 1987**). Le génome du VIH-1 est caractérisé par une grande variabilité et un polymorphisme d'une souche à une autre. Cependant la structure génétique est toujours similaire. On retrouve de l'extrémité 5'-P à l'extrémité 3'-OH l'organisation suivante : LTR-*gag-pol-vif-vpr-vpu-env-tat-rev-nef*-LTR.

L'ARN virionique est flanqué de séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaison à des protéines cellulaires : ce sont les LTR (*Long Terminal Repeat*). Neuf cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frames*, ORFs) sont présents, chacun correspondant à un gène. Certains de ces gènes codent pour plusieurs protéines via un précurseur : ce sont les gènes de structure *gag*, *pol* et *env* ; les autres gènes constituent les gènes de régulation. Deux protéines sont codées en deux exons : Tat et Rev.

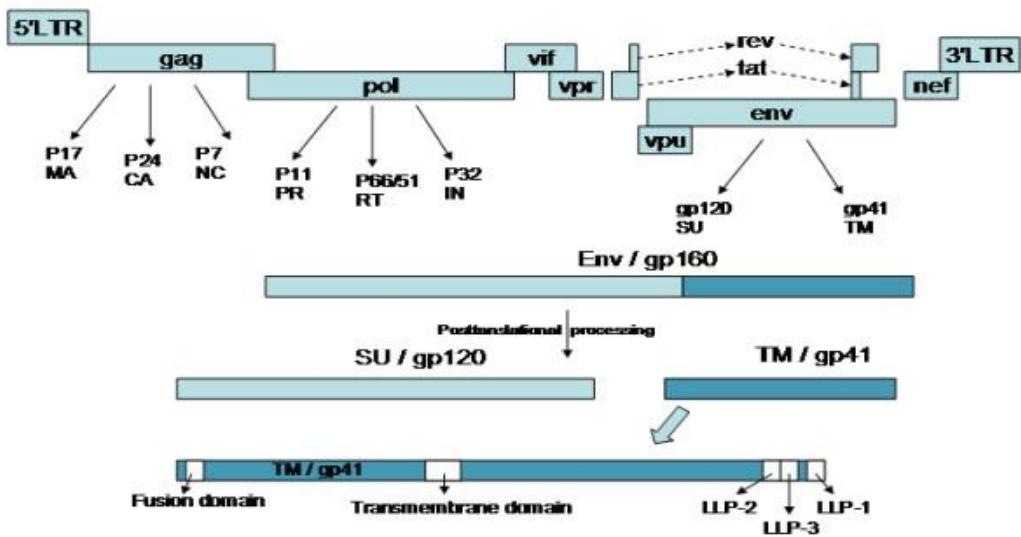


Figure 4: Schéma de l'organisation génomique du VIH-1 (Costin JM, 2007).

### II.2.1 Les régions répétées terminales (LTR)

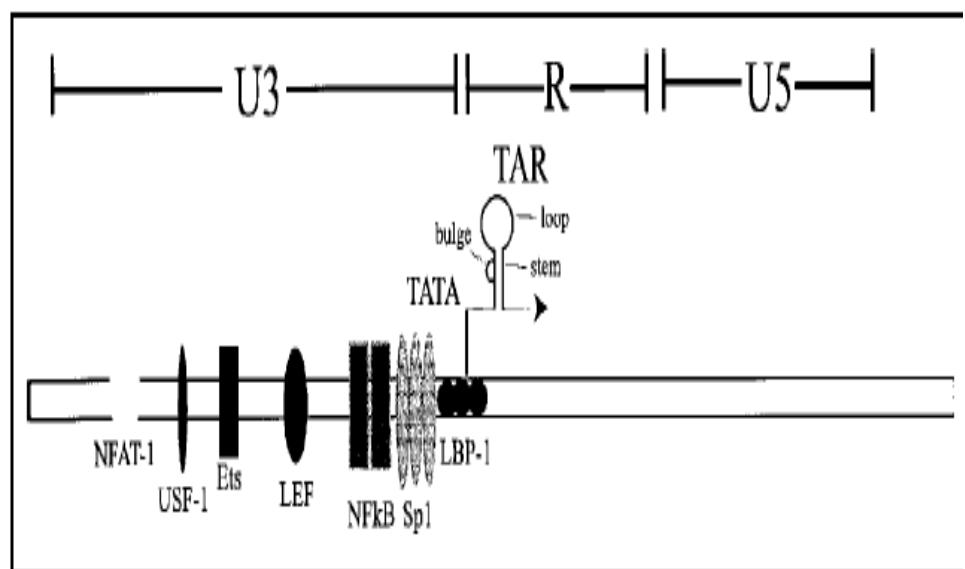
Les LTR (Long Terminal Repeat) constituent deux régions du génome viral non codantes. Elles sont composées de trois régions : U5, R, U3. Ces régions sont impliquées dans l'initiation de la rétrotranscription et l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (**Perkins et coll., 1993**).

La région U3 comprend des sites de liaisons pour des facteurs de transcription cellulaires dont le NFkB (séquence stimulatrice ou *enhancer*, le SP1 ou encore la boîte TATA, signal de démarrage de la transcription de l'ARN messager. Le site de démarrage de la transcription se trouve à la jonction U3/R. Le NFkB est présent dans tous les isolats des VIH-1 et VIH-2, cependant, les souches virales du sous-type C du VIH-1 en renferment 3 à 4 copies (**Montano MA et coll., 1997 ; Neogi U et coll., 2011**). Le taux de transcription du sous-type C plus important en comparaison aux autres sous-types, serait lié à cette particularité, ce qui expliquerait en partie sa grande représentativité mondiale, d'environ 50% (**Bachu M et coll., 2012**).

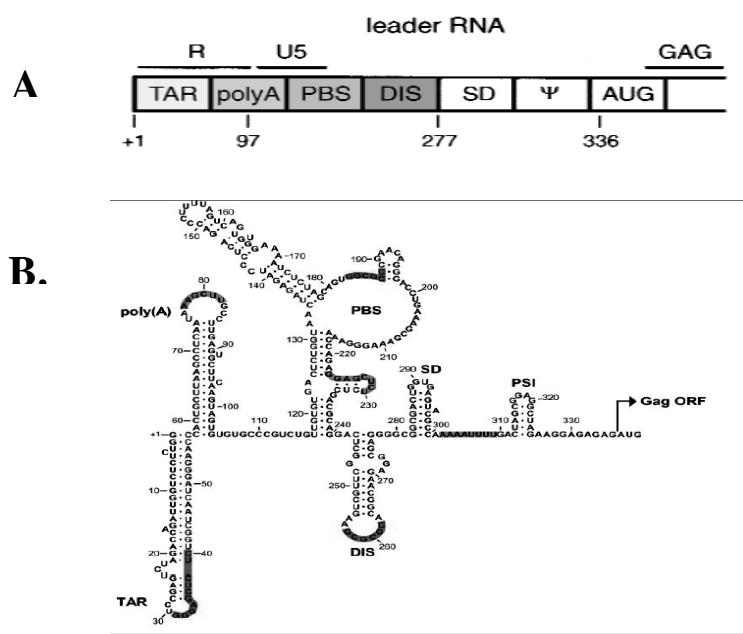
Les sites de fixation du facteur SP1 ont la propriété de réguler non seulement d'autres facteurs de transcription cellulaire, d'interagir avec la protéine Tat mais aussi avec le NFkB pour induire la transcription (**Perkins ND et coll., 1993**).

Les régions R et U5 sont incluses dans le « leader RNA » présentant une structure en épingle à cheveux, constitué de différents éléments (TAR, polyA, PBS, DIS, SD, PSI). 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 B, 1996 ; Baig TT coll., 2007 ; Heng X et coll., 2012).

Le « leader RNA » situé en 5' est la région la plus conservée du génome du VIH-1 (Lu K et coll., 2011).



**Figure 5 : Schéma du LTR 5' du provirus, indiquant la position des sites de liaison de certains facteurs cellulaires (Freed O, 2001).**



**Figure 6 : 6. A et 6.B : Schéma du leader RNA du provirus ;  
A : Huthoff H and Berkhout B, 2001; B : Andersen ES et coll., 2004**

L'**élément TAR** (trans-activation responsive region), grâce à un site de liaison spécifique est impliqué dans la régulation par la protéine Tat de la transcription de l'ADN proviral en ARN messager et ARN génomique. Avec sa structure secondaire en épingle à cheveux, il joue un rôle essentiel dans l'activation de la transcription et dans la réPLICATION virale. La déstabilisation de la structure de TAR affecte les capacités de réPLICATION (**Vrolijk M et coll., 2008 ; Das AT et coll.; 2012**). TAR interviendrait également dans le processus de dimérisation du génome viral (**Andersen ES et coll., 2004**) et d'encapsidation de l'ARN génomique (**Clever JL et coll., 2002**). En effet la déletion de l'élément TAR provoquerait une réDUCTION de l'encapsidation (**Heng X et coll., 2012**). TAR jouerait aussi un rôle dans l'étape de transfert de brin pendant la rétrotranscription (**Berkhout B, 2001**).

**Le signal poly (A)** intervient dans la polyadénylation des ARNm viraux (**Berkhout B, 1996**).

**Le PBS** ou *Primer Binding Site* est le site de liaison à l'ARN<sub>t3</sub><sup>Lys</sup>. Primordial pour la transcription de l'ARN génomique en ADN proviral, il sert de première amorce à la transcriptase inverse lors du processus de rétro-transcription (**Leiman L et coll., 2004 ; Heng X et coll., 2012**). L'ARN<sub>t3</sub><sup>Lys</sup> se lie par ailleurs au PAS pour Primer activation signal situé en amont du PBS (**Beerens N et Berkout B, 2002**). L'hybridation de l'ARN<sub>t3</sub><sup>Lys</sup> à l'ARN viral via le PAS et le PBS est facilitée par p7NC Nucléocapside mature ou par le précurseur polyprotéique Gag (**Guo F et coll., 2009**).

**Le DIS** ou signal de dimérisation situé en aval de la région LTR5', correspond à une boucle en épingle à cheveux. Son rôle est l'hybridation des 2 brins d'ARN l'un à l'autre pour former un complexe qui sera intégrée dans la future particule virale. Le processus de dimérisation qui constitue une étape cruciale de la réPLICATION virale, n'est pas encore entièrement élucidé (**Andersen SE et coll., 2004 ; Sakuragi J et coll., 2007 ; Cao S et Chen SJ, 2011**).

**Le signal d'encapsidation PSI** ( $\psi$ ), sur lequel s'accroche la nucléocapside est spécifique des ARN génomiques viraux. Il démarre à la fin du LTR 5' et recouvre les premiers acides aminés de Gag. Il se compose de 4 domaines, SL1, SL2, SL3, SL4, formant chacun une structure en boucle. Le plus conservé d'entre-eux est le domaine SL3 (**Clever JL et coll., 2002**).

**Le LTR 3'** est identique du point de vue structural que le LTR 5', mais diffère de ce dernier sur le plan fonctionnel. Seuls ses éléments de terminaison et de polyadénylation des ARN messagers sont utilisés.

## **II.2.2 Les gènes de structure**

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

Le gène *gag* est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. La protéine Gag est nécessaire à l’assemblage et au bourgeonnement de particules virales à la surface des cellules infectées (**Shehu-Xhilaga et coll., 2001**). D’environ 1500pb, le gène code pour la polyprotéine Pr55<sup>Gag</sup> qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsidé (CA), la Nucléocapside (NC) et la p6. Au cours de la maturation, le clivage de la Pr55<sup>Gag</sup> par la protéase virale (PR) donne les protéines structurales du virion mature p17MA, p24CA, p7NC, p6, plus 2 petits fragments p1gag et p2gag (**Freed EO, 1998 ; Turner BG et Summers MF, 1999 ; Adamson CS, 2012**).

#### **Matrice virale p17MA**

Constituée par la protéine p17MA, elle participe à la stabilité de la structure virale, grâce à sa liaison avec la bicoche phospholipidique qui sert d’enveloppe virale. La protéine de la matrice p17MA est impliquée dans les 2 phases (précoce et tardive) de la réPLICATION virale et dans la production de particules infectieuses. Elle est aussi impliquée dans le recrutement et l’incorporation des glycoprotéines d’enveloppe (gp120/gp41) à la surface des virions (**Davis M et coll., 2006 ; Murakami T 2012**).

Le rôle de la MA dans l’incorporation des glycoprotéines d’enveloppe, concerneurait un glutamate hautement conservé en position 99 situé au niveau de sa poche hydrophobe C-terminale (**Brandano L et Stevenson M, 2012**). La matrice MA aurait également des propriétés d’encapsidation de l’ARN viral (**Swanstrom R et coll., 1997 ; Ott DE et coll., 2005**).

La p17MA est essentielle à la pénétration du virus dans les cellules par la régulation de la fusion entre les deux membranes virale et cellulaire (**Murakami T et coll., 2004**) et intervient dans les étapes précoces de la réPLICATION virale en modulant la décapsidation.

La p17 MA fait partie intégrante du complexe de pré-intégration et joue un rôle dans le transport nucléaire du génome viral (**Haffar OK et coll., 2000**). La protéine pourrait dans certaines situations, se substituer à la nucléocapside, probablement grâce à la faculté de concentrer les protéines Pr55Gag, en les liant aux molécules d’ARN (**Ott DE et coll., 2005; Alfadhli A et coll., 2009**).

#### **La Capsidé p24CA**

C’est la protéine majeure du *core* du virus. Il s’agit d’une protéine phosphorylée de 24kD qui se présente sous forme oligomérique. Elle se condense autour du génome viral pour générer la nucléocapside de forme conique qui comprend 2 domaines indépendants.

Les deux domaines de la capsidé sont reliés de manière covalente par un lien flexible (**Gamble TR et coll., 1997**) et ils semblent être eux-mêmes exceptionnellement flexibles (**Mateu MG, 2009**).

La partie C-terminale, contient la région homologue majeure (MHR pour *major homology region*) très conservée qui apparaît comme essentielle pour l'assemblage de la particule virale (**Gamble TR et coll., 1997 ; Leschonsky B et coll., 2007**).

La région N-terminale du gène, particulièrement les résidus proline, serait indispensable à la morphogenèse d'une capsidé conique mature et au caractère infectieux des particules virales néoformées (**Fitzon T et coll., 2000; Tang S et coll., 2003 ; Rulli SJ et coll., 2006**).

### La protéine p7 NC

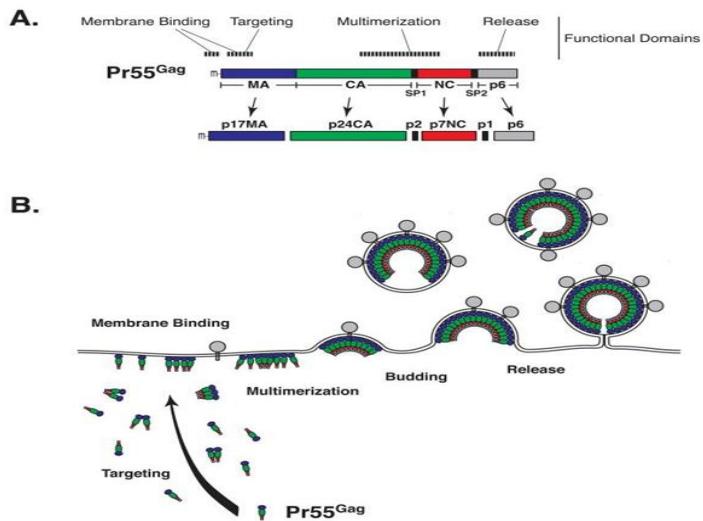
La p7 NC est une petite protéine fortement basique de moins de 100 acides aminés. Elle lie l'ARN génomique dont elle assure l'encapsidation dans le virion en assemblage (**D'Souza V et Summers MF, 2005**). Elle est indispensable à la dimérisation de l'ARN viral (**Feng YX et coll., 1999 ; Song R et coll., 2007**) et permet l'initiation de la transcription inverse en favorisant l'accrochage de l'amorce de transcription, l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup> (**Hargittai et coll., 2001 ; Graham WD et coll., 2011**). La p7, intervient par ailleurs dans la stabilisation de l'ADN viral néosynthétisé et dans le processus d'intégration. En augmentant l'efficacité de chacune de ces étapes, elle contribue à la formation de particules virales infectieuses (**Thomas JA et Gorelick RJ, 2008**).

### La protéine p6

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

### Les peptides p1 et p2

Ils permettent la régulation de l'activité de la protéase. La p2, située entre les protéines de la capsidé et la protéine de la Nucléocapsidé, est essentielle à l'assemblage et à la production de particules virales infectieuses (**Krausslich HG et coll., 1995 ; Guo X et coll., 2005**). Le site p2/NC serait de loin le site de clivage le plus variable. Avec la diversité intra sous type, cette variation serait de 18,66% dans le sous-type B, plus importante pour les sous-types non B, elle atteindrait 42,42% dans le sous-type C (**De Oliveira T et coll., 2003 ; Liegeois F et coll., 2013**).



**Figure 7 a et b : Organisation du gène *gag* et production des particules virales. (Ono A, 2009).**  
**a :** Organisation génomique du gène *gag* et sites fonctionnels ; **b :** Interaction entre la protéine Pr55<sup>Gag</sup> et la membrane phospholipidique.

### II.2.2.2 Le gène *pol* (gène codant pour les enzymes virales)

C'est le gène le plus conservé du génome viral avec une divergence intra sous-type d'environ 9 à 11% (Santos AF et Soares MA, 2010). Il code pour les 3 enzymes virales, protéase (PR), transcriptase inverse (TI) et intégrase (IN) qui sont obtenues après clivage du précurseur Pr160Gag-Pol.

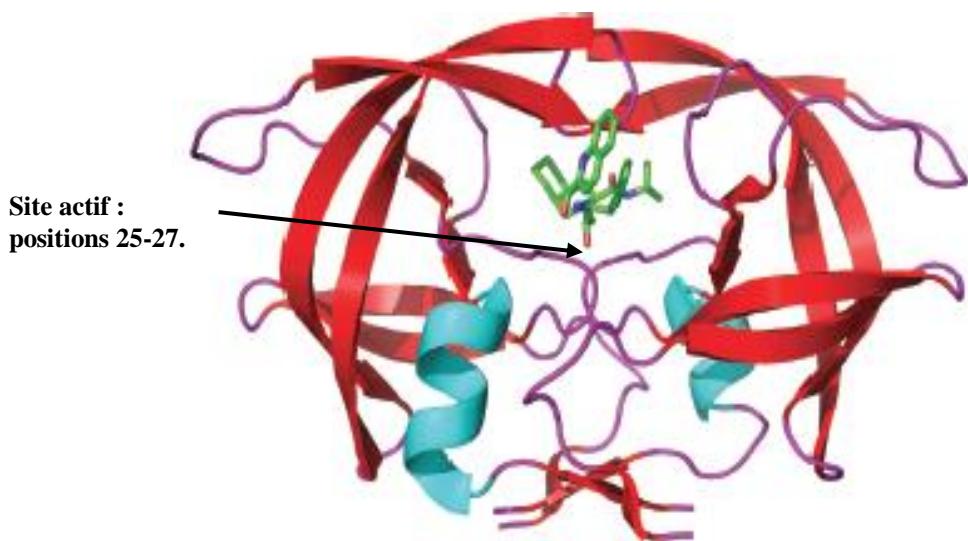
La Pr160Gag-Pol est une polyprotéine engendrée parallèlement au précurseur Pr55gag mais en moindre quantité. Il est incorporé sous forme non clivée dans la particule virale. Son clivage intervient lors de la maturation, étape faisant suite au bourgeonnement des virus néoformés.

Le clivage de la polyprotéine Pr160Gag-Pol se fait par la partie enzymatique de ce précurseur (protéase) ainsi que le précurseur Pr55<sup>Gag</sup>. Lors de la maturation, la proportion relative de chacun de ces 2 précurseurs influence sur le pouvoir infectieux des virus néoformés (Shehu-Xhilaga M et coll., 2001).

#### II.2.2.2.1 La protéase virale PR

La protéase appartient à la famille très conservée des aspartyl-protéases dont le résidu catalytique est un acide aspartique (résidu 25). C'est l'enzyme essentielle à la maturation et production de particules virales infectieuses. Indispensable au processus post-traductionnel, elle assure le clivage des polyprotéines Pr55<sup>Gag</sup> et P160<sup>Gag-Pol</sup>. Active, elle se présente structurellement, sous forme d'un homodimère de 99 acides aminés (Swanson R et coll., 1997).

Les deux monomères sont liés de façon non covalente et symétrique par 4 chaînes  $\beta$ -antiparallèles. (Cf. Figure 8). L'activité enzymatique de la protéase est assurée par 2 molécules d'acide aspartique situées au cœur du site catalytique de l'enzyme constitué par la triade Asp-Thr-Gly aux positions 25 à 27. Cette triade conservée se trouve à la jonction des deux monomères ; elle forme ainsi un tunnel, permettant une interaction avec 7 à 9 acides aminés, dont l'activité aboutit au clivage de 9 séquences peptidiques différentes. Cela aboutit à la synthèse des protéines P17, P24, P6 et P7, à partir du gène *gag*, et des enzymes Protéase, RT et Intégrase à partir de la polyprotéine Gag-Pol. Ce clivage semble s'effectuer à des sites bien précis de ces protéines, grâce à une affinité qui diffère entre les sites (Pettit SC et coll., 1993).



**Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 (Adamson CS, 2012).**  
En vert, un inhibiteur de protéase (le Saquinavir) lié au site actif de l'enzyme

### II.2.2.2 La transcriptase inverse TI ou Reverse Transcriptase (RT)

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

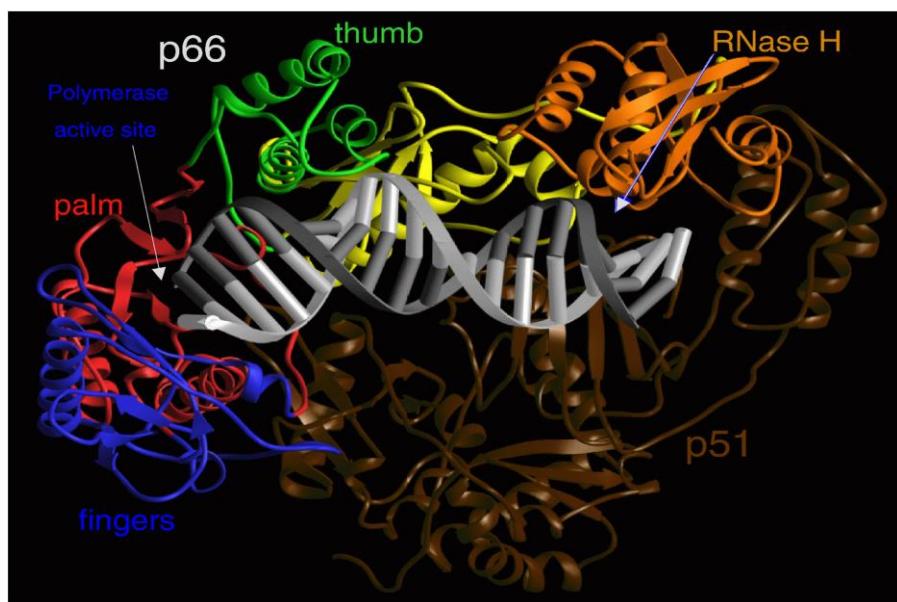
La structure de la transcriptase inverse se présente sous forme d'un hétérodimère constitué de 2 sous unités, la P66 et la P51 (di Marzo Veronese F et coll., 1986). La grande sous unité, P66 (de 560 acides aminés), comprend les 2 domaines fonctionnels de la RT :

la polymérase et le domaine RNase H. La petite sous-unité, P51, contient les 440 premiers acides aminés de la P66 correspondant (mais pas entièrement), au domaine de la polymérase.

Le domaine P66 ressemble à une main droite. Il est divisé en 4 sous-domaines dénommés « doigts », « pouce », « paume » et enfin le sous-domaine de connexion qui lie les domaines polymérase et Rnase H (Cf. Figure 9).

La P51 présente les mêmes 4 sous-domaines retrouvés dans le domaine polymérase de la P66, mais avec des relations physiques entre ces sous-domaines différentes de celles de la P66. En effet, la P51 ne possède pas d'activité enzymatique et ne joue pas de rôle direct dans le processus de polymérisation (**Kohlstaedt LA et coll., 1992**). Ceci s'explique par le fait que malgré la présence des 3 acides aminés (Asp 110, Asp 185 et Asp 186) au niveau du site catalytique du domaine polymérase (paume) de la petite sous-unité, celui-ci ne présente pas d'activité de polymérase fonctionnelle. La fonction primaire de la P51 se limiterait uniquement au maintien de la structure active de la P66 (**Hughes SH, 2001 ; Mulky A et coll., 2005**).

La Rnase H représente la partie C-terminale de la P66, d'une longueur de 120 acides aminés. Son rôle est l'hydrolyse du 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 (**Sevilya Z et coll., 2003 ; Bochner R et coll., 2008**).



**Figure 9 : Schéma de la transcriptase inverse (dans un complexe avec un acide nucléique) avec ces deux sous unités (p66 et p51) et leurs sous domaines. (Sarafianos SG et coll., 2009).**

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

### II.2.2.2.3 L'intégrase IN

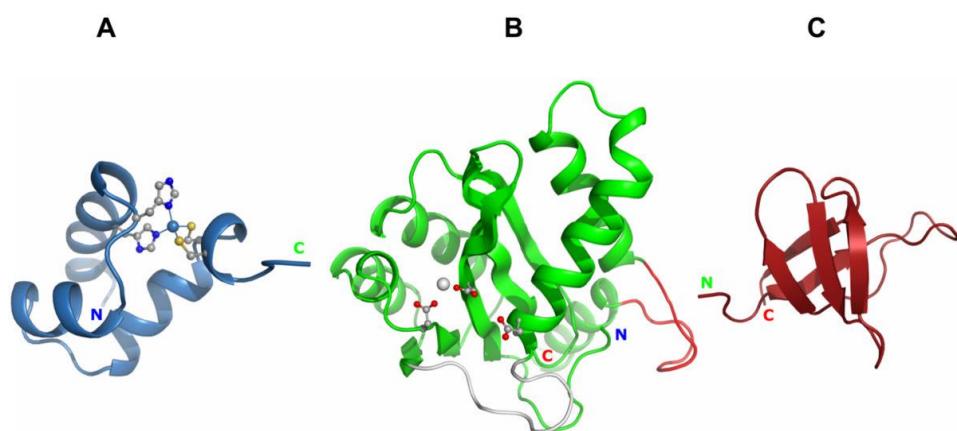
Il s'agit d'une protéine de 288 acides aminés, obtenu par clivage protéase-dépendante de la polyprotéine Gag-Pol qui comprend 3 domaines indépendants : **i)** un domaine N-terminal avec un motif en doigt de zinc (**Zheng R et coll., 1996**). **ii)** un domaine central ou domaine catalytique impliqué dans la liaison avec les extrémités de l'ADN viral (**Johnson AA et coll., 2006 ; Nowotny M, 2009**), **iii)** un domaine C-terminal qui lie l'ADN viral de façon non spécifique et qui participe essentiellement à la stabilité du complexe ADN-IN (**Chen JC et coll., 2000**).

C'est l'intégrase IN qui catalyse l'insertion de l'ADN double brin néo-synthétisé dans le génome de la cellule nouvellement infectée. Elle fonctionne sous forme oligomérique. Il semble que chacun des domaines de la protéine participe à cette oligomérisation (**Hare S et coll., 2009**).

L'intégrase possède 2 activités catalytiques majeures : un clivage endonucléolytique au niveau des extrémités 3'-OH du génome viral préparant l'ADN au processus d'intégration et un transfert de brin permettant l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire cible.

Au cours de la première étape, dite de maturation, les extrémités des LTR de l'ADN viral sont reconnues et coupées spécifiquement par l'intégrase (IN), sous forme oligomérique, avec libération d'un dinucléotide 5'GT3'.

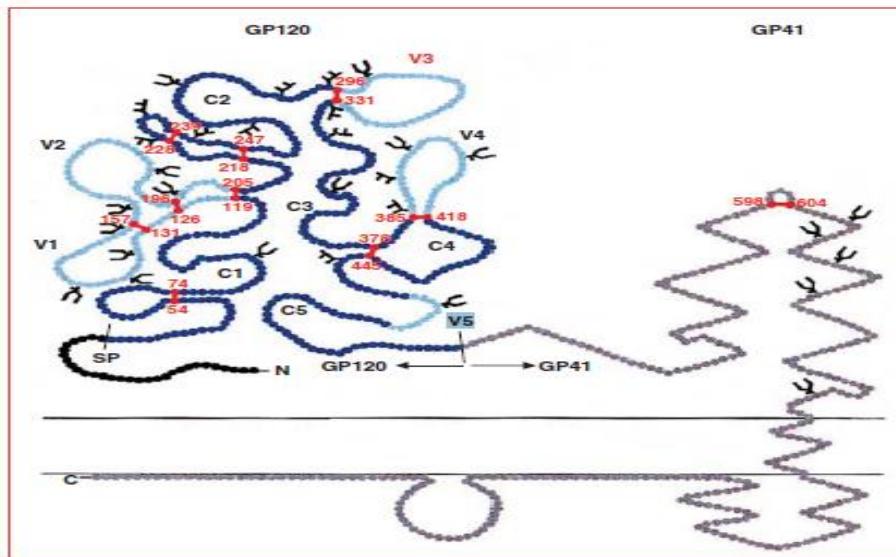
Au cours de la deuxième étape, dite de transfert de brins, chaque groupement 3'-OH généré par excision attaque un brin de l'ADN cellulaire pour intégrer l'ADN viral dans le génome cellulaire via un mécanisme de transestérification (**Jaskolski M et coll., 2009**). Cette étape du cycle de multiplication virale est la cible de nouvelles molécules ARV : les anti-intégrases qui agissent en amont de l'intégration du provirus et bloquent ainsi le transport du complexe de pré-intégration (**Nair V et coll., 2007**).



**Figure 10 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH. (Jaskolski et coll., 2009).**  
Le domaine N-terminal en bleu (**A**), le domaine CCD en vert avec les résidus DDE en petites boules rouge (**B**) et le domaine carboxy-terminale en rouge (**C**)

### II.2.2.3 Le Gène *env* (gène codant pour les protéines de l'enveloppe)

Il code pour les glycoprotéines d'enveloppe, gp120SU et gp41TM équivalents respectivement pour le VIH-2 aux gp125 et gp36. Ils sont responsables de la fixation du virus sur le récepteur cellulaire et son entrée dans la cellule hôte. Leur emplacement sur la surface du virus fait d'eux des cibles idéales pour les anticorps neutralisants (**Center RJ et coll., 2002**). Le gène *env* est le gène viral le plus variable. Son polymorphisme important permet au virus d'échapper au système immunitaire (**Twigg Arrildit K et coll., 2012**). Les glycoprotéines Env sont initialement synthétisées sous forme d'un précurseur polyprotéique, la gp160 qui sera modifiée par glycosylation avant d'être clivée par une protéase cellulaire en 2 protéines (gp120 et gp41). Lors du bourgeonnement, 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. Les données sur les événements menant à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe sont assez connus, mais leur mécanisme exact reste encore incertain (**Checkley MA et coll., 2011**). Quand elles sont matures et fonctionnelles, les deux protéines gp120-gp41 se présentent à la surface du virus sous forme de trimères d'hétérodimère (**Center RJ et coll., 2002**) et forment un complexe de fusion membranaire de classe I : 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 (**Berger EA et coll., 1999 ; Gaibelet G et coll., 2006**). La gp41 contient le domaine de trimérisation ; il est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire (**Chan DC et coll., 1997; Buzon V et coll., 2010**).



**Figure 11: Représentation schématique du précurseur gp160 (Pancera M, 2005).**

En noir, le peptide signal (SP). En bleu, la glycoprotéine de surface gp120, En bleu foncé les régions conservées (C1-C5) et en bleu clair les boucles variables (V1-V5). En gris, la glycoprotéine transmembranaire gp41 contenant une boucle formée par un pont disulfure. Les sites de glycosylation des chaînes mannosides (F) et des chaînes glycosidiques complexes (Y) sont indiqués. Sont indiqués en rouge, les résidus cystéines (numérotés) et les ponts disulfures.

### **II.2.2.3.1 Glycoprotéine de surface, gp120**

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

Le site de liaison entre la gp120 et la molécule CD4 est situé entre les domaines conservés C3 et C4. L'interaction gp120-gp41 est responsable d'un changement conformationnel important au sein de la gp120 qui déplace les boucles V1/V2 afin d'exposer le site de liaison du corécepteur CCR5 ou CXCR4. Ce sont des éléments de la boucle V3 et certains résidus de la région C4 qui participent à la formation de ce site (**Ashish GR et coll., 2006**). C'est également la boucle V3 qui est responsable du tropisme du virus en déterminant le choix du récepteur aux chimiokines, CCR5 ou CXCR4. L'augmentation de charges positives favorise la liaison au récepteur CXCR4 plutôt que celle du CCR5 (**Basmaciogullari S et coll., 2002**). Les boucles variables V1/V2, sont aussi probablement des points de contact pour le site du récepteur CD4, mais ne sont pas indispensables pour l'infection des cellules cibles (**Kolchinsky P et coll., 2001**).

D'un point de vue antigénique, la gp120 induit la synthèse d'anticorps neutralisants dirigés contre les sites conservés de liaison du récepteur et des corécepteurs. Les boucles variables peuvent également induire efficacement des anticorps neutralisants, mais ces derniers sont généralement spécifiques des souches et lorsque le virus mute pour échapper à l'action du système immunitaire, ils deviennent inefficaces (**Yang ZY et coll., 2004**).

### **II.2.2.3.2 Glycoprotéine transmembranaire gp41TM**

La glycoprotéine Gp41TM contient un domaine N-terminal fusogénique, promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminal de la Gp120SU par des liaisons non covalentes (**Pancera M, 2005**). Sa structure se présente sous forme d'un trimère composé de 340 acides aminés composée de 4 domaines : **i)** un ectodomaine N-terminal d'environ 180 acides aminés qui contient quatre sites de N-glycosylation, **ii)** un pont disulfure qui intervient dans la formation des complexes trimériques, **iii)** une ancre transmembranaire et **iv)** un long domaine intra cytoplasmique contenant des motifs variés qui contribuent à la réplication virale (**Chan DC et coll., 1997 ; Center RJ et coll., 2002**).

L'ectodomaine comprend une vingtaine d'acides aminés hydrophobes appelée peptide fusion en position N-terminale et deux régions de répétitions d'heptapeptides contigus, HR1 (responsable de la trimérisation de la protéine) et HR2. 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. En même temps s'effectue un changement conformationnel au niveau des régions HR1 et HR2, ce qui permet de rapprocher les membranes virales et cellulaires (**Eckert DM et Kim PS, 2001 ; Sackett K et coll., 2006 ; Esté JA et Telenti A, 2007**). Les inhibiteurs de fusion s'opposent à ce changement en se liant à la région HR1 (**Liu S et coll., 2007**).

Au plan antigénique, la gp41 induit la formation de deux types d'anticorps : des anticorps neutralisants dirigés contre la région de l'ectodomaine proche de la membrane (**Montero M et coll., 2008**) et des anticorps non neutralisants au niveau de la boucle immunodominante de l'extrémité N-terminale de la région HR2 (**Gorny MK et coll., 2000 ; Checkley M et coll., 2011**).

### II.2.3 Les gènes accessoires

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

#### II.2.3.1 Les gènes de régulation

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

Sa fonction essentielle est d'activer la transcription des ARNm viraux. Il code pour la protéine Tat (*trans-activator of transcription*) qui agit en activant la réPLICATION virale au niveau d'une séquence cible appelée TAR (TransActing Region) située dans le LTR (**Weeks KM et coll., 1990 ; Brady J et coll., 2005**).

Sans la protéine Tat, la transcription est très vite arrêtée et ne permet plus la synthèse d'ARNm fonctionnels (**Cullen BR et coll., 1990**). La protéine Tat a donc pour rôle d'augmenter le niveau de la transcription et agit aussi bien sur l'initiation de la transcription que sur l'elongation.

L'activation de la transcription peut également être TAR indépendante soit par une liaison directe de Tat sur le NFkB (**Dandekar DH et coll., 2004**), soit par liaison avec la protéine histone chaperonne hNAP-1 (**Vardabasso C et coll., 2008**).

Tat peut également agir comme une toxine virale contribuant à la pathogenèse du SIDA. Libérée de façon active dans le milieu extra-cellulaire par les cellules infectées, Tat peut pénétrer par endocytose dans les macrophages et les lymphocytes T pour activer non seulement la transcription des cellules infectées en état de latence, mais induire également l'apoptose des cellules voisines non infectées, majorant la déplétion en lymphocyte TCD4.

La protéine Tat aurait aussi une activité, très largement controversée, de régulation sur la transcription inverse de l'ARN en ADNc (**Liang C et coll., 2002 ; Appoloni A et coll., 2003 ; Appoloni A et coll., 2007**).

Tat bloquerait une activité de transcription inverse prématuée qui pourrait survenir avant la formation de particules virales matures en s'associant aux molécules d'ARN néo formées ; 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 C et coll., 2002**). Tat supprimerait également l'elongation de la chaîne d'ADN dans les phases tardives de la transcription inverse mais favoriserait l'hybridation de l'amorce ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup> au niveau du *primer binding site* sur la matrice d'ARN au cours des étapes précoces de la RT (**Kameoka M et coll., 2002**).

#### Le gène rev (regulator of expression virus)

C'est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression et à la maturation virale. Il code pour la phosphoprotéine de 19 kd, pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule-hôte. Il intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure en assurant la stabilisation et le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme (**Karn et coll., 2012**). Le site de reconnaissance de la protéine sur l'ARN est le domaine RRE (*Rev Responsive Element*) qui est une séquence du gène *env*, et ce sont plusieurs monomères de Rev qui vont de façon séquentielle se lier au RRE (**Pollard VW et Malim MH, 1998 ; Pond SJK et coll., 2009 ; Hoffmann D et coll., 2012**). Rev est rapidement recyclé entre le cytoplasme et le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NSE).

Par ailleurs, des études ont fourni la preuve que Rev neutralise également l'intégration du VIH-1 et facilite l'encapsidation de l'ARN du génome viral (**Hoffmann D et coll., 2012**).

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 (**Rosenbluh J et coll., 2007 ; Levin A et coll., 2009**).

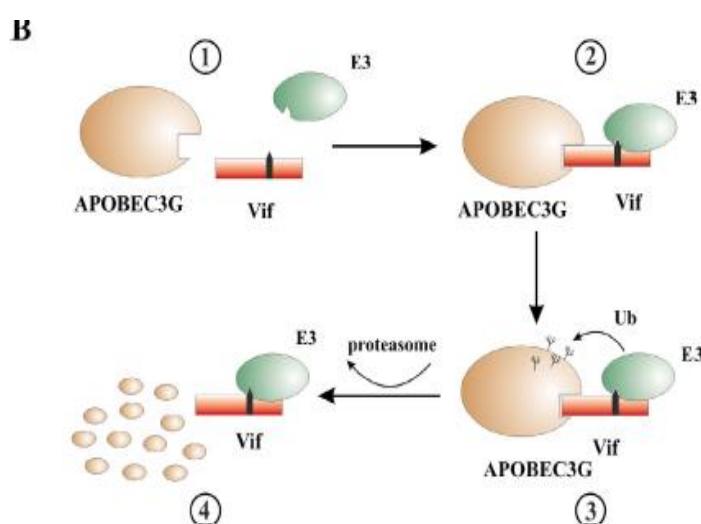
Elle jouerait également un rôle de régulateur dans la traduction des RNA (**Groom HCT et coll., 2009**) et dans le processus d'encapsidation de l'ARN (**Brandt S et coll., 2007**).

### II.2.3.2 Les gènes auxiliaires

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

Bien que n'intervenant pas dans la production des particules virales, le gène *vif* est impliqué dans leur infectivité. En effet en son absence, les particules virales produites sont défectueuses. La protéine Vif existe à des taux élevés sous une forme libre dans le cytosol (**Li L et coll., 2005**).

Vif est un facteur important qui s'oppose à l'encapsidation d'une protéine cellulaire anti-virale, l'APOBEC3G (**Schafer A et coll., 2004**), une cytidine désaminase qui entraîne la désamination des desoxycytidines, et conduit ainsi la formation d'un ADNc de mauvaise qualité qui sera éliminé par le système de réparation de la machinerie cellulaire (**Li XY et coll., 2007 ; Kourteva et coll., 2012**). Vif, se lie directement à APOBEC3G et favorise sa dégradation suite au recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase qui va accélérer sa polyubiquitylation et sa destruction par les protéasomes (**Goila-Gaur R et coll., 2008**). Cependant, il a été démontré qu'une substitution spécifique d'un seul acide aminé dans APOBEC3G humaine conférait une résistance à l'action de Vif (**Xu H et coll., 2004**). 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 par interaction avec la protéase virale de façon spécifique. Vif joue également un rôle dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique par une liaison directe avec la région 5' du génome et régule la transcription inverse en favorisant entre autre la liaison de l'ARNt<sup>Lys</sup> avec l'enzyme (**Guo F et coll., 2007**).



**Figure 12 : Modèles de dégradation de APOBEC3G induite par la protéine Vif (Goila-Gaur R et coll., 2008)**

### Le gène vpr (viral protein R)

Il code pour une protéine de 14 kD qui contribue à la pathogenèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR et le transport du complexe de pré intégration dans le noyau (**Le Rouzic E et Benichou S, 2005**). Intervenant dans la transcription inverse, elle influence la fidélité de l'enzyme dont le taux d'erreur est réduit d'environ 4 fois grâce à son interaction avec l'uracil DNA glycosylase (UNG) (**Mansky LM et coll., 2000 ; Chen R et coll., 2004**).

Les molécules de Vpr sont cytotoxiques. Elles induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et sont capables d'induire l'apoptose par action directe sur les mitochondries (**Sharma A et coll., 2012**). Cependant, le mécanisme par lequel elles ciblent et dégrade les protéines de l'hôte n'a pas encore été clairement élucidée (**Wen X et coll., 2012**). Un résidu Arginine en position 77 jouerait un rôle crucial dans la capacité de Vpr à induire l'apoptose via la perméabilisation de la membrane mitochondriale (**Lum JJ et coll., 2003 ; Andersen JL et coll., 2008**).

### Le gène vpu (viral protein U)

Il est retrouvé dans le génome du VIH-1. Absent dans le génome du VIH-2, il est remplacé par le gène Vpx (**Tristem M et coll., 1992**). Il code pour une protéine de 81 acides aminés qui s'accroche à la membrane cellulaire via son extrémité N-terminale non située dans le virion. Cette protéine a 2 fonctions essentielles : la dégradation des molécules CD4 nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique et la stimulation du relargage des virions (**Hussain A et coll., 2008 ; Mitchell B et coll., 2009**).

La protéine Vpu se lie aux molécules CD4 nouvellement synthétisées et recrute un complexe E3 ubiquitine ligase qui accélère sa polyubiquitylation et favorise sa destruction par les protéasomes (**Schubert U et coll., 1998**). Cette régulation permet de limiter la liaison CD4-Env au niveau du réticulum endoplasmique (RE) de sorte à faciliter l'incorporation des glycoprotéines dans les virions en formation, mais aussi d'empêcher la rétention des virions à la surface des cellules via des interactions CD4-Env (**Lama J et coll., 1999**). La protéine Vpu est également capable de retenir les molécules CD4 dans le RE par un mécanisme qui pourrait être lié à un signal de rétention dans le RE porté par Vpu qui s'opposerait à la sortie du complexe CD4-Vpu (**Magadán J G et coll., 2010**).

La protéine Vpu stimule le relargage des virions en s'opposant à l'action antivirale d'une protéine cellulaire décrite sous le nom de « tetherin » ou CD317, BST-2 ou HM1.24 BST-2 (**Perez-Caballero D et coll., 2009**). Cette protéine induite par l'interféron, piège les particules virales néo-synthétisées à la surface de la cellule. L'attachement des virions à la membrane cytoplasmique aboutit ainsi à leur internalisation par endocytose plutôt qu'à leur relargage dans le milieu extracellulaire.

L'action de la protéine Vpu sur la « tetherin » est également observée pour Nef et Env. L'analyse détaillée de la tetherin, sa distribution à la surface de la membrane plasmique de la cellule infectée, ainsi que le nombre de molécules de tetherin impliquées dans ce phénomène ne sont pas tout à fait élucidés (**Lehmann M et coll., 2011**).

La protéine Vpu entraîne une déplétion du taux de tetherin cellulaire en induisant une dégradation protéasomale ou endo-lysosomale (**Mitchell RS et coll., 2009**). Elle peut également détacher la Tetherin de la surface des cellules en la redirigeant et en la séquestrant dans un compartiment périnucléaire qui bloque ainsi son activité (**Hauser H et coll., 2010**). Il a été rapporté que cette activité anti-tetherin n'est pas la même pour tous les groupes du VIH-1. Elle est beaucoup plus importante pour les souches de VIH-1 du groupe M qui sont capables de réduire de 5 à 6 fois la concentration de la tetherin à la surface des CD4 (**Sauter D et Kirchhoff F, 2011**). Par opposition, il a été démontré qu'elle est modeste pour les VIH des groupes O et N (**Sauter D et coll., 2009 ; Yang SJ et coll., 2010**) et l'est encore moins pour les VIH-1 du groupe P (**Sauter D et Kirchhoff F, 2011**). Ceci étant, il semblerait qu'une mutation ponctuelle au niveau d'un résidu d'acide aminé de la tetherin humaine pourrait entraîner une résistance à l'action inhibitrice de la *Vpu* (**Gupta RK et coll., 2009**).

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

Il code pour une protéine très conservée de 24-32kD myristilée en N terminale qui contribue à la pathogenèse du VIH à travers multiples effets biologiques favorisant la réPLICATION virale et l'infectivité (**Miller MD et coll., 1994, Jeremiah FR et coll., 2006**). L'exemple le plus frappant sur l'importance du gène *nef* dans la pathogenèse du VIH est traduit par l'état des patients progresseurs à long terme. Ces derniers infectés par des virus présentant une délétion importante au niveau du gène *nef*, ne présentaient de signes d'immunodépression qu'après 14-18 ans (**Learnmont JC et coll., 1999**). Ce fait a été prouvé par la suppression du gène au niveau de cellules VIH en réPLICATION (**Meuwissen PJ et coll., 2012**). Nef favorise l'infection virale par activation des lymphocytes TCD4 qui deviennent ainsi plus sensibles à l'infection (**Baur AS et coll., 1994**). Il inhibe également l'expression des molécules responsables du pouvoir cytotoxique sur le VIH à la surface des cellules cytotoxiques (naturel Killer) ou NK (**Matusali G et coll., 2012**). Il a été montré que la protéine Nef facilite la transmission du virus aux cellules CD4 activées, médiée par les récepteurs DC-SIGN (**St. Gelais C et coll., 2012**).

Nef protège les cellules infectées de l'action des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) voisines en réduisant l'expression des molécules CMH de classe I et en favorisant leur apoptose par activation de l'expression de FasL à la surface des cellules (**Xu XN et coll., 1999, Schaefer MR et coll., 2008**). Pour cette activité, elle a besoin de la coopération de la protéine Vpu. (**Matusali G et coll., 2012**). La protéine Nef améliore l'infectiosité des particules virales (**Madrid R et coll., 2005**) et augmente leur production en réduisant l'expression du récepteur CD4 qui peut interférer avec le processus de bourgeonnement et de libération des virions néo formés (**Lama J et coll., 1999 ; Schaefer MR et coll., 2008**). Cette activité de Nef requiert la présence d'une région hautement conservée du gène formée d'un triplet d'acides aminés (VGF) pour valine-glycine-phénylalanine (**Meuwissen PJ et coll., 2012**).

## **II.3 Tropisme et réPLICATION du VIH**

### **II.3.1 Tropisme**

L'utilisation par le virus de l'un ou l'autre de ces corécepteurs détermine le tropisme de la souche virale (**Moore JP et coll., 1997**). Les souches M-tropiques utilisent principalement le récepteur CCR5 pour infecter la cellule hôte. Elles ont été de ce fait nommées R5. Les souches T-tropiques, utilisant préférentiellement le co-récepteur CXCR4 quant à elles, ont été appelées X4.

Une troisième population virale désignée R5X4 ou dual-tropic est capable de se fixer aussi bien sur le co-récepteur CCR5 que sur le co-récepteur CXCR4 (**Church JD et coll., 2010 ; Goodenow MM et Collman RG, 2006**). Comme les isolats viraux X4, les virus R5X4 sont corrélés à une forte dépression en lymphocytes T et l'apparition d'infections opportunistes liées au SIDA (**Waters L et coll., 2008**). Le tropisme viral est principalement lié à l'identité de certains acides aminés présents dans la boucle variable V3 de la gp120 (**Bunnik EM et coll., 2011**).

### **II.3.2 RéPLICATION virALE du VIH**

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

Le cycle de réPLICATION est composé de plusieurs étapes pouvant être divisées en 2 phases :

- une phase précoce qui commence par l'attachement du virus sur son récepteur spécifique et finit par l'intégration de l'ADN dans le génome cellulaire.
- une phase tardive qui débute par l'expression des gènes viraux et aboutit à la libération des virions par bourgeonnement à la surface de la membrane cellulaire. La cible principale du VIH est la cellule TCD4+ (**Barre-Sinoussi F et coll., 1983**).

### **II.3.2.1 Phase précoce : attachement - entrée - décapsidation et transcription inverse - intégration de l'ADN viral à l'ADN de la cellule hôte**

#### **II.3.2.1.1 L'attachement des particules virales**

Le cycle de réplication du VIH, semblable à celui des autres rétrovirus débute par l'adsorption du virus sur la cellule cible. Cet attachement est le résultat d'une interaction entre la gp120 et une variété de molécules dont la protéoglycane à héparane sulfate présentes sur la membrane des cellules hôtes. Cette molécule, qui constitue le facteur d'attachement le plus utilisé par les virus enveloppés et notamment le VIH, permet de concentrer les virus à la surface des cellules cibles afin d'augmenter la probabilité de sa liaison avec les récepteurs spécifiques (**Mondor I et coll., 1998 ; Crublet E et coll., 2008**). Elles ne sont pas impliquées directement dans le processus de fusion membranaire mais sont considérées comme des facteurs favorisant ou facilitant l'infection virale (**Marsh M et Helenius A, 2006**).

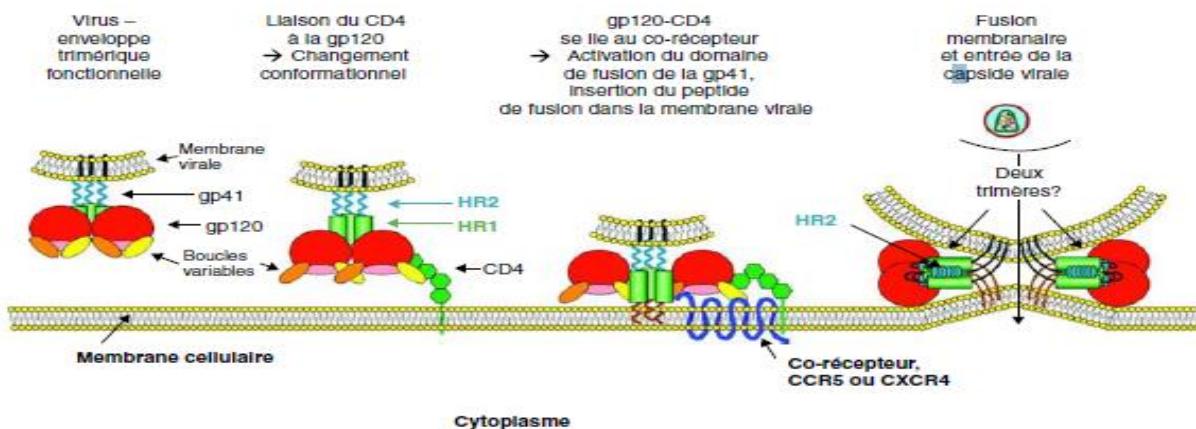
L'héparane sulfate est également impliquée dans la capture et l'attachement des particules virales à la surface des spermatozoïdes qui vont, de façon efficace transmettre les virus aux cellules dendritiques (CD) par un contact de cellule à cellule (**Ceballos A et coll., 2009**). Les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans l'attachement des particules virales par l'intermédiaire d'une lectine nommée DC-SIGN (Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) et DC-SIGNR (DC-SIGN related). L'interaction entre gp120 et DC-SIGN permet au virus d'utiliser les cellules dendritiques comme un moyen infaillible de capture des virions au niveau des sites périphériques d'infection et de transport vers les ganglions lymphatiques (**Pohlmann S et coll., 2001 ; Donaghy H et coll., 2006**). C'est ainsi que l'infection des cellules exprimant les récepteurs spécifiques d'entrée du virus est favorisée. Outre ses fonctions de capture et facilitation d'entrée du VIH et sa capacité à pouvoir transmettre des virions aux lymphocytes, la molécule DC-SIGN, possède le remarquable pouvoir d'amplifier l'infection virale.

En effet, des doses sub-optimales insuffisantes pour produire une infection des cellules CD4, deviennent infectieuses si le virus est d'abord capturé par les cellules dendritiques ou des lignées cellulaires transférées par DC-SIGN. Ce phénomène remarquable a été rapporté uniquement pour le VIH (**Geijtenbeek TB et coll., 2000**).

### II.3.2.1.2 L'entrée

L'entrée du virus dans la cellule cible fait intervenir les glycoprotéines de l'enveloppe virale et des récepteurs cellulaires spécifiques. C'est ainsi que la gp120 reconnaît à la surface de la cellule, le récepteur CD4.

L'association entre les deux molécules (gp 120 et CD4) provoque au niveau de chacune d'entre-elle un changement conformationnel, permettant le recrutement des co-récepteurs de chimiokines, CXCR4 ou CCR5 (**Gallo SA et coll., 2003 ; Pancera M, 2005**). Cette deuxième interaction entraîne la modification de la structure de gp41 impliquant les régions HR1 et HR2 (**Melikyan GB et coll., 2000**) et permet au peptide hydrophobe "fusogénique" se situant à son extrémité N-terminale de se déployer et de pénétrer dans la bicoche lipidique de la membrane cellulaire. Un dernier changement de conformation de la gp41 permet le rapprochement et la fusion des deux membranes, conduisant au transfert de la capsidé virale dans la cellule cible (**Pierson TC et Doms RW, 2003 ; Esté JA et coll., 2007**).



**Figure 13 : différentes phases de l'entrée du VIH dans la cellule hôte (Pancera M, 2005).**

La gp120 reconnaît et se lie au récepteur CD4 et au co-récepteur. Cette liaison entraîne des changements de conformation qui permettent au peptide de fusion de la gp41 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible en formant un état de transition : *pre-hairpin*. La gp120 se dissocie du complexe et la gp41 subit d'autres transformations qui conduisent au faisceau d'hélices. La formation du faisceau de 6 hélices permet la fusion complète des deux membranes (virale et cellulaire) qui conduit à la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule cible.

### **II.3.2.1.3 Décapsidation et transcription inverse**

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

La décapsidation n'est pas un processus spontané. Elle est soumise à la régulation par des facteurs cellulaires, telles que des enzymes provenant du lymphocyte T CD4+ activé (**Auewarakul et coll., 2005**). Plus récemment, il a été démontré que cette décapsidation serait également liée à une phosphorylation au niveau des résidus sérine de la capsid et une activité peptidyl propyl isomérase qui provoquerait une dissociation des interactions CA-CA entre protéines constitutives de la capsid, ce qui se traduirait par la déstructuration de la nucléocapside (**Misumi S et coll., 2010**).

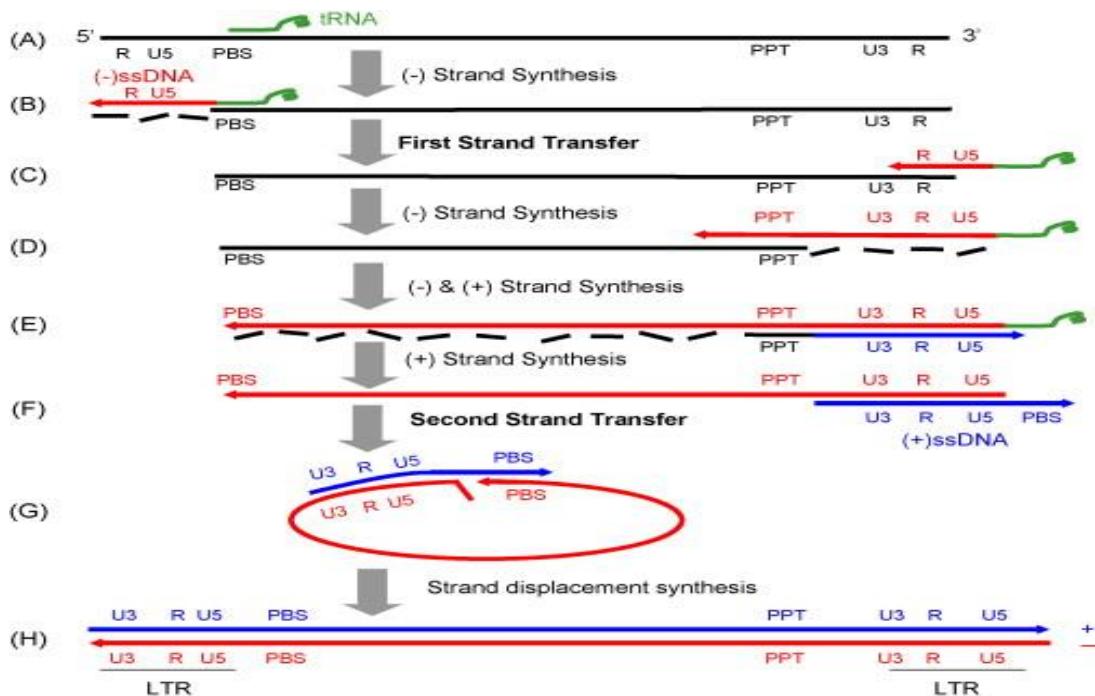
La Reverse transcriptase (RT) dispose de deux activités enzymatiques, une ADN polymérase qui est capable de copier soit un ADN ou une matrice d'ARN et une RNase H dont le rôle est le clivage d'un ARN faisant partie d'un duplex ARN/ADN. Les deux fonctions enzymatiques de RT, la polymérase et RNase H, coopèrent pour convertir l'ARN en un ADN double brin dans le cytoplasme de la cellule infectée (**Sarafianos SG et coll., 2009**). Le processus de transcription inverse serait régulé par des facteurs cellulaires (**Warrilow D et coll., 2008**) et il semblerait que son initiation soit couplée au début de la décapsidation (**Zhang H et coll., 2000**).

L'ARN viral intégré dans le complexe de rétrotranscription de haut poids moléculaire comprenant entre autres, la transcriptase inverse, l'intégrase, Vpr, l'ARN<sup>Lys</sup>, MA et des facteurs cellulaires, va subir en plusieurs étapes une rétrotranscription en ADNc (**Cf. Figure 15**).

La transcription inverse démarre au niveau de l'extrémité 5' de la matrice d'ARN(+), un ARN de transfert lysine 3 (ARNtlys) qui sert d'amorce, va se fixer au primer binding site (PBS), situé dans la région U5 en 5' de l'ARN du génome viral. La fixation de l'ARNt<sup>Lys</sup> sur la matrice d'ARN serait favorisée par les protéines Vif (**Guo F et coll., 2007**) et Tat (**Kameoka M et coll., 2002**). A partir de l'extrémité 3' de cet ARNt lys, les régions U5 et R, situées à l'extrémité 5' du génome viral, sont transcrrites par la transcriptase inverse. Ensuite le brin d'ADN(-) néo-synthétisé s'apparie au niveau de la région R de l'extrémité 3' de la matrice d'ARN(+), ce qui conduit à un transfert intra ou intermoléculaire. L'ADN(-) sert alors d'amorce pour poursuivre sa propre synthèse. La partie RNase H de la transcriptase inverse dégrade alors l'ARN du duplex ADN-ARN ainsi formé à l'exclusion du domaine PPT (pour polypurine tract sequence) qui sert d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN.

La synthèse du deuxième brin d'ADN nécessite un deuxième saut de brin et conduit à la formation de deux segments de taille identique se chevauchant partiellement. Ce court chevauchement de brins nommé triplex central ou “ DNA flap ” est un élément essentiel de l'étape d'import nucléaire.

Les phénomènes de transfert de brin qui peuvent être fortement inhibés par la protéine antivirale APOBEC3G sont sous la dépendance de la protéine Vif (**Li XY et coll., 2007**). Cette étape est une des cibles des traitements anti-VIH par les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse qui bloquent la synthèse du provirus et ainsi empêche toute possibilité d'intégration de ce dernier au génome de la cellule hôte.



**Figure 14 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral (Basu VP et coll., 2008)**

**A** : Initiation de la transcription inverse par l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup>, qui s'hybride partiellement avec la région PBS de l'ARN génomique.

**B** : Synthèse du début du brin d'ADN (-), en rouge, suivie de son arrêt rapide et la dégradation de l'extrémité 5' de l'ARN viral.

**C** : 1<sup>er</sup> saut de brin : hybridation de la séquence R de l'ADN (-) avec celle de l'extrémité 3' de l'ARN viral.

**D** : Poursuite de la synthèse du brin d'ADN (-) avec dégradation parallèle de l'ARN viral, à l'exception de la séquence PPT.

**E** : L'ARN PPT non dégradé sert d'amorce à la synthèse (jusqu'à l'extrémité U5) du brin (+) d'ADN viral en rouge.

**F** : La séquence PBS du brin (+) est synthétisée à partir de l'ARNt et après sa dégradation, survient le 2<sup>ème</sup> saut de brin.

**G** : Poursuite de la synthèse du brin d'ADN (+).

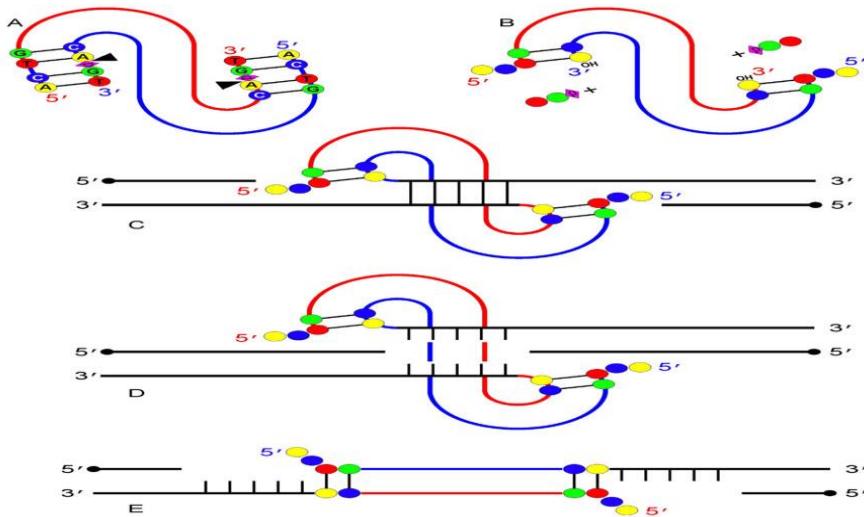
**H** : La synthèse s'achève au niveau des extrémités LTR pour aboutir à 2 séquences terminales

#### **II.3.2.1.4 L'intégration de l'ADN viral**

L'ADN bicaténaire néosynthétisé est associé aux protéines virales MA, TI, IN et Vpr avec lesquelles il forme le complexe de préintégration. Ce dernier quitte le cytoplasme pour se diriger vers le noyau grâce à la protéine Vpr qui va permettre sa translocation par son interaction avec un canal ionique de la membrane nucléaire.

Des protéines du complexe de pré-intégration notamment, celle de la matrice et des facteurs cellulaires interviendraient dans cette étape ; cependant, leur rôle n'est pas clairement établi (**Le Rouzic E and Benichou S, 2005 ; Nitahara-Kasahara Y et coll., 2007**).

L'intégration de l'ADN viral dans celui de la cellule hôte s'effectue en deux étapes. (Cf. **Figure 17**). D'abord, l'intégrase se lie à une courte séquence au niveau des LTR qui catalyse un clivage endonucléotidique avec élimination d'un dinucléotide aux deux extrémités de chaque LTR. Ensuite, l'ADN est clivé et sert de substrat à la réaction d'intégration ou de transfert de brin conduisant à l'insertion covalente de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. Cette deuxième étape, s'effectue simultanément aux deux extrémités de la molécule d'ADN viral avec un décalage de cinq paires de bases de part et d'autre des deux points d'insertion. Il s'agit d'une réaction de trans-estérification en une étape avec rupture d'une liaison phosphodiester par suite d'une attaque nucléophile. Enfin, l'ADN proviral ainsi intégré, subit l'action réparatrice des enzymes de la cellule hôte qui vont permettre la jonction au niveau des extrémités 5' des LTR grâce à un processus de duplication des séquences de l'ADN cible limitant le provirus intégré (**Delelis O et coll., 2008**). Les sites d'intégration se trouvent principalement dans les unités de transcription actives de l'ADN cellulaire (**Mitchell RS et coll., 2004**).



**Figure 15 : Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réPLICATION du virus (Jaskolski M et coll., 2009).**

### II.3.2.2 Phase tardive : Transcription assemblage bourgeonnement et maturation

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

La période qui sépare l'infection de l'apparition de la maladie, correspond à la phase de latence, qui est cliniquement silencieuse, mais virologiquement active. Pendant cette phase, il y a un équilibre entre la quantité de virus produite quotidiennement et celle détruite par le système immunitaire (Nisole S et Saïb A, 2004).

#### II.3.2.2.1 La transcription

Après l'intégration, le provirus intégré peut connaître deux sorts. Soit il reste latent ; soit il se comporte comme un gène cellulaire et démarre une transcription active. Cette transcription de l'ADN proviral est en grande partie régie par des facteurs de transcription cellulaire et se fait par l'ARNpol II cellulaire ADN dépendante.

Même si ce sont les sites de régulation des LTR qui permettent l'initiation de cette transcription, la protéine Tat joue un rôle primordial.

En effet, l'ARN polymérase II cellulaire est généralement activée suite à une interaction entre la protéine Tat, un motif particulier au niveau de l'élément TAR et différents facteurs cellulaires dont le NFkB (**Brady J et Kashanchi F, 2005**). Cependant, l'activation de la transcription peut également se faire suite à une liaison directe entre Tat et les protéines cellulaires (**Dandekar DH et coll., 2004 ; Vardabasso C et coll., 2008**).

Après transcription de l'ADN proviral, trois catégories d'ARNm sont générées : **i)** L'ARN génomique codant pour les précurseurs Gag et Gag-Pol, **ii)** les ARN mono-épissés codant pour le précurseur Env et pour les protéines Vpu, Vif et Vpr et **iii)** les ARNm multi-épissées qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef. La transcription aboutit donc à la production de transcrits primaires équivalents à des messagers précoces qui vont donner les protéines de régulation Tat, Rev et Nef. Ces dernières, retournant dans le noyau, vont amplifier la production des différents messagers viraux, de l'ARN génomique et favoriser l'expression des protéines dites tardives Gag, Pol, Vif, Vpr, Env et Tat (**Freed EO, 2001**).

La régulation des ARNm épissés et non épissés est assurée par la protéine Rev qui assure le transport des transcrits primaires ou mono-épissées du noyau au cytoplasme (**Pond SJK et coll., 2009**).

### II.3.2.2.2 L'assemblage

La formation du virion débute par l'auto-assemblage des molécules du précurseur Pr55Gag au niveau de la face interne de la membrane plasmique, à proximité d'une zone où sont exprimées les glycoprotéines d'enveloppe. L'assemblage du virus est un phénomène bien étudié, par contre comment le VIH-1 sélectionne des sites spécifiques sur la membrane plasmique pour amorcer son assemblage, ne l'est que partiellement (**Jouvenet et coll., 2011**). Par ailleurs, le mécanisme de cet auto-assemblage, n'est pas connu avec exactitude (**Murakami T et coll., 2012**).

Cet assemblage dépend principalement de Pr55Gag dont l'expression est suffisante pour permettre la production de pseudo-particules virales en l'absence des glycoprotéines d'enveloppe, de RT, de protéase et d'ARN génomique (**Wills JW et Craven RC, 1991 ; Göttlinger HG, 2001**). Le précurseur Pr55Gag contient ainsi toute l'information morphopoïétique nécessaire à la formation des particules virales.

C'est lui (Pr55Gag) qui assure l'incorporation des constituants indispensables participant à l'élaboration de particules virales infectieuses. La capacité d'assemblage du Pr55Gag est liée aux propriétés intrinsèques du précurseur relatives aux différents domaines le composant.

Il est probable que, l'utilisation d'un précurseur sous la forme non clivée dans le cytoplasme permet d'optimiser au maximum le regroupement des constituants protéiques au niveau du site d'assemblage.

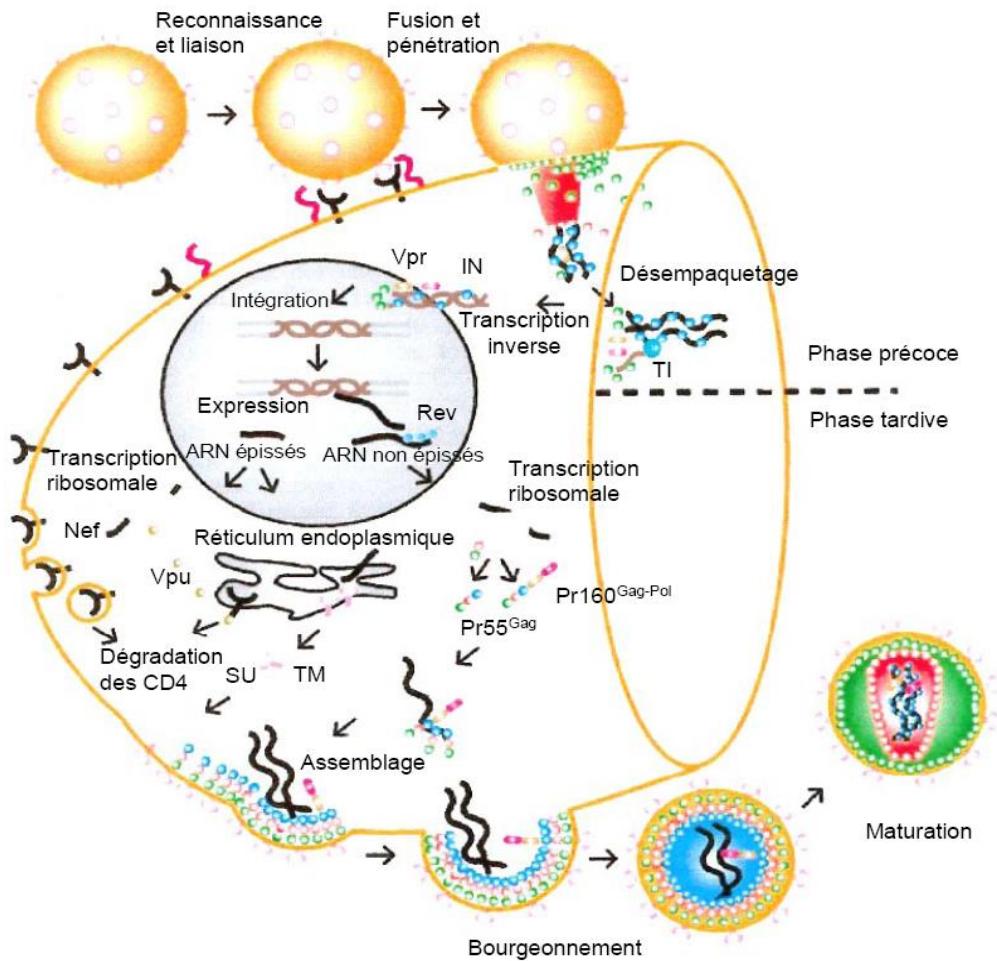
Par ailleurs, l'alignement conservé des régions MA-CA-NC reflète à la fois la chronologie d'intervention des diverses parties et leur répartition de l'extérieur vers l'intérieur de la particule virale mature (**Chazal N, 2005**).

### **II.3.2.2.3 Bourgeonnement et maturation**

Le bourgeonnement correspond au détachement de la particule virale de la surface de la cellule cible. Ce détachement intervient après formation complète de la particule virale. Il a été mis en évidence que le détachement du virus de la cellule nécessite la protéine Vpu qui stimule le relargage des virions en s'opposant à l'action antivirale de la tetherin dont le rôle est le piégeage des particules virales néo-synthétisées à la surface de la cellule (**Perez-Caballero D et coll., 2009 ; Hauser H et coll., 2010**).

La maturation survient immédiatement après ou de façon concomitante avec le bourgeonnement des particules virales. Le virus néoformé amorce alors une modification architecturale de ses différentes protéines constitutives qui le fait passer d'un état immature et non infectieux à un état mature et infectieux. Il s'agit d'un processus hautement contrôlé et séquentiel assuré par la protéase virale dont l'activation dépend de sa dimérisation et de la présence du précurseur Pr160Gag-Pol (**Scarlata S et Carter C, 2003**).

Des clivages dont l'ordre est régi par des différences d'affinité de la protéase pour les sites de coupure, engendrent un réarrangement de la particule : la protéine MA reste collée sous la membrane phospholipidique, tandis que la nucléocapside se place le long des deux copies ARN, la capside se condense en une forme conique et la particule est alors infectieuse (**Chazal N, 2005**).



**Figure 16 : Cycle de réplication du VIH-1 (Turner BG et Summer MF, 1999)**

Le diagnostic de l'infection par le VIH est une étape cruciale qui permet au patient de bénéficier de la prise en charge, notamment aux ARV et du suivi de la pathologie. Le virus provoque chez un sujet contaminé, une infection chronique. Cette infection fait coexister dans l'organisme le virus et la réponse immunitaire dirigée contre ce dernier.

Ces deux éléments servent de base pour le diagnostic de l'infection qui depuis le développement des premiers tests en 1985 a connu de grandes révolutions autant en termes de nature du prélèvement biologique qu'en termes de techniques utilisées.

## **II. 4 Diagnostic et monitoring virologique de l'infection par le VIH**

### **II.4.1 Diagnostic**

#### **Prélèvements utilisés**

Les prélèvements utilisés pour diagnostiquer une infection par le VIH sont de deux types :

##### **II.4.1.1 Prélèvement sanguin sur tube**

Le diagnostic sérologique de l'infection par le VIH s'effectue classiquement sur un prélèvement de sang veineux effectué au pli du coude. Cette technique nécessite l'utilisation d'un matériel plus ou moins onéreux : tubes de prélèvements, système de prélèvement sous vide ou système « seringue et aiguille » classique. Par ailleurs, la conservation des échantillons et leur traitement nécessitent un équipement électrique : réfrigérateur et centrifugeuse. Vu les inconvénients que présentent les prélèvements classiques de sang veineux, il a été développé des techniques de prélèvements alternatifs non invasifs.

##### **II.4.1.2 Prélèvements alternatifs**

Dans le cadre du diagnostic biologique de l'infection par le VIH, outre le sang et ses dérivés, d'autres fluides corporels sont utilisés comme prélèvements altératifs. Il s'agit de la salive, des urines, de gouttes de sang ou plasma séchées sur papier buvard pour respectivement DBS (Dried Blood Spot) et DPS (Dried Plasma Spot) et enfin de spécimens de sérum ou plasma séchés sur tube pour DTS (Dried Tube Specimen).

##### **II.4.1.2.1 Nature**

###### **Prélèvement salivaire**

Il a été démontré l'existence d'anticorps anti-VIH au niveau de la salive de sujets infectés par le virus (**Buchér JB et coll., 2007 ; Debattista J et coll., 2007**). Le grand défi à l'utilisation de ce fluide était son niveau d'IgG très bas en comparaison avec le sérum ou le plasma. Le développement de kits commerciaux équipés d'un dispositif de prélèvement permettant l'obtention d'un exsudat salivaire à niveau de concentration en anticorps plus élevé a rendu possible le dépistage de l'infection à partir de la salive. C'est le cas d'OraQuick Rapid HIV-1/2 Antibody Test (OraSure Technologies, Bethlehem, PA, USA) (**Holguín A et coll., 2009**).

Approuvé par la FDA en 2012 pour une utilisation personnelle (auto-test) au Etats Unis (**Katz DA et coll., 2012**), il donne une bonne sensibilité et spécificité (**Pascoe SJ et coll., 2009 ; Zachary D et coll., 2012**).



**Figure 17 : Dispositif et résultats de prélèvement salivaire<sup>17</sup>**

### **Prélèvement urinaire**

Même s'il a été démontré la présence d'anticorps anti-VIH dans ce fluide biologique, les faibles performances des tests urinaires, ont très tôt limité son utilisation pour le diagnostic de l'infection (**Kagulire SC et coll., 2007**).

### **Prélèvement de gouttes de sang/plasma séchées sur papier buvard**

La technique Dried Blood Spot (DBS) en anglais, consiste en un prélèvement et dépôt de gouttes de sang capillaire (au bout du doigt ou au niveau du talon) sur de cercles pré-imprimés de papier buvard commercialisé sous forme de carte.

Les gouttes de plasma ou sérum séchées sur papier buvard selon le même procédé ou « Dried Plasma Spot » (DPS) sont également utilisés pour la quantification de la charge virale et l'étude de la résistance aux ARV (**García-Lerma JG et coll., 2009 ; Monleau M et coll., 2009**).

### **Sérum ou plasma séché sur tube (Dried Tube Specimen ou DTS)**

Dans le cadre du contrôle de la qualité, le DTS constitue une bonne alternative aux prélèvements classiques de sérum ou de plasma qui nécessitent des conditions strictes de transport et de stockage peu adaptées aux pays à ressources limitées. Les spécimens (plasma ou sérum) sont préparés par séchage sur tube pendant la nuit à température ambiante, après ajout d'un colorant spécifique qui n'affecte pas la qualité du test.

---

<sup>17</sup> [http://www.orasure.com/\\_staging/docs/pdfs/products/oraquick\\_advance/OraQuick-Advance-Package-Insert-CE-FR.pdf](http://www.orasure.com/_staging/docs/pdfs/products/oraquick_advance/OraQuick-Advance-Package-Insert-CE-FR.pdf) (Consulté le 24/10/2013).

Au moment de l'analyse, la reconstitution de l'échantillon se fait par réhydratation avec du tampon PBS-Tween. La méthode DTS est pratique pour le contrôle de qualité du dépistage du VIH dans les pays à ressources limitées (**Parekh BS et coll., 2010**).

#### **II.4.1.2.2 Avantages et domaines d'application**

Les prélèvements alternatifs présentent de nombreux avantages en comparaison au prélèvement de sang veineux. Ils sont de transport et stockage faciles, présentent une faible infectiosité liée à leur caractère non invasif, minimisent les coûts (**Roberts T et coll., 2012**) et s'adaptent à l'usage pédiatrique (**Gupta A et coll., 2013**). Ils sont utilisé dans le diagnostic de l'infection chez l'adulte (**Kharsany AB et coll., 2012**) et le nourrisson (**Gupta A et coll., 2013**), pour les tests moléculaires de quantification de la charge virale (**Neogi U et coll., 2012**), les études de la résistance aux ARV (**Aitken SC et coll., 2013**) et de la surveillance de la résistance transmise (**Duc NB et coll., 2012**), ainsi que le contrôle de la qualité (**Parekh BS et coll., 2010**). Utilisés dans le cadre des enquêtes épidémiologiques, ils réduisent le taux de refus de prélèvement ou de participation (**Floch JJ, 1990 ; Pascoe SJ et coll., 2009**)

#### **II.4.1.3 Méthodes de diagnostic du VIH**

Le diagnostic biologique de l'infection à VIH repose sur deux types de tests :

- tests indirects ou sérologiques qui permettent de détecter à partir d'un prélèvement de sang les anticorps produits par le système immunitaire contre les antigènes du virus.
- tests directs reposant sur la mise en évidence du virus lui-même ou certains de ces constituants<sup>18</sup>. Cependant, malgré les importants progrès enregistrés par les méthodes de biologie moléculaire, le diagnostic biologique de routine de l'infection par le VIH, repose essentiellement sur la recherche des anticorps spécifiques du virus.

##### **II.4.1.3.1 Méthodes directes**

Elles sont réservées à des laboratoires spécialisés et situations particulières (suspicion de primo-infection ou variants particuliers, diagnostic du nouveau né, infection par un variant non détectable par les trousse commerciales, primo-infection, résultat de Western Blot indéterminé).

---

<sup>18</sup> [http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/VIROLOGY/OMS\\_2005\\_Le\\_VIH\\_et\\_son\\_diagnostic.pdf](http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/VIROLOGY/OMS_2005_Le_VIH_et_son_diagnostic.pdf) (Consulté, le 12/07/2013).

#### **II.4.1.3.1.1 Mise en évidence du virus**

Il s'agit d'une technique réalisée *in vitro* par co-culture des lymphocytes du sujet suspect d'infection avec des lymphocytes provenant d'un donneur séronégatif qui stimule la réPLICATION virale. La détection d'une activité « transcriptase inverse » ou de l'Ag p24 dans le surnageant de culture signe la présence du VIH. Le délai d'obtention des résultats est longue (10 jrs à 1 mois), couteuse et nécessite des laboratoires de haute sécurité pour protéger le biologiste et les manipulations. Pour toutes ces raisons et grâce aux progrès des techniques de biologie moléculaire, on fait de moins en moins recours à l'isolement du virus.

#### **II.4.1.3.1.2 Mise en évidence du génome viral**

##### ***Recherche de l'ADN proviral***

Cette recherche de l'ADN proviral du VIH dans le réservoir cellulaire repose sur l'utilisation de la PCR (ADN) sur des cellules mononucléées du sang périphérique. La technique impose une expérience en biologie moléculaire et reste réservée à des laboratoires spécialisés. Il n'existe pas de technique standardisée pour cette méthode et les performances des PCR-ADN réalisées selon des techniques développées dans chaque laboratoire sont variables. La recherche de l'ADN proviral ne fait pas partie des examens de routine pour le diagnostic biologique de l'infection due au VIH.

##### ***Détection de l'ARN plasmatique***

La détection se fait par PCR : technique de détection et identification *in vitro* des acides nucléiques proviraux dans le plasma. Le taux d'ARN-VIH : « charge virale » est variable et peut atteindre des valeurs élevées : jusqu'à  $10^6$  -  $10^7$  copies par ml de plasma. Sa présence dans le plasma témoigne de la réPLICATION virale dans l'organisme. Bien que conçue pour le suivi de la thérapie ARV, la PCR ARN, peut être utilisée dans un objectif de diagnostic. Très utile pour les laboratoires de recherche, elle n'est pas encore indiquée pour les laboratoires de routine.

#### **II.4.1.3.1.3 Mise en évidence de la protéine p24 : Antigénémie p24**

Quoique intéressante à doser, l'antigénémie p24 n'est détectable (dans le sérum ou dans le plasma) qu'aux 2 extrémités de l'infection : avant la séroconversion et lors de l'évolution vers le stade SIDA. Elle n'est par ailleurs détectable que lorsque la charge virale est de l'ordre de  $10^4$  copies d'ARN-VIH par ml de plasma. L'épreuve de détection des antigènes emploie la technique ELISA (3ème génération).

## **II.4.1.3.2 Méthodes indirectes**

### **II.4.1.3.2.1 Tests de dépistage**

Il s'agit de tests utilisés en première intention.

#### **II.4.1.3.2.1.1 Tests ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) ou tests immuno-enzymatiques.**

Ce sont les méthodes de référence utilisées en routine pour le diagnostic de l'infection (**Amadou A et coll., 2005**). Leur principe est basé sur une réaction antigène-anticorps par les méthodes immuno-enzymatiques, mettant en contact, le sérum du sujet à tester et les antigènes vitaux spécifiques du VIH, fixés sur un support solide. On distingue 5 formats ELISA en fonction du principe : ELISA indirect, ELISA de compétition, ELISA d'Immunocapture des anticorps, ELISA sandwich et ELISA combiné. Cependant les deux derniers formats sont les plus utilisés. Avec la grande variabilité des souches VIH circulantes, un intérêt particulier doit être accordé à la composition antigénique des tests utilisés (**Sohn AH et coll., 2009**). Les exigences auxquelles un test doit être soumis actuellement est de pouvoir détecter les anticorps anti-VIH-1 du groupe M, O et anti-VIH-2. En principe, les tests actuellement sur le marché répondent à ces exigences.

Selon les antigènes utilisés et les particularités techniques de la réaction, on distingue des :

- **ELISA de première et de deuxième génération** utilisant comme antigène des lysats de cellules infectées par le VIH qui mettent en évidence des anticorps de la classe des IgG. Leur format est de type indirect pour la première génération et indirect ou compétition pour la deuxième génération. La première génération donne de nombreux résultats faussement positifs et une détection tardive de la séroconversion.
- **ELISA de deuxième génération** qui raccourcissent de 10 jours le délai de séroconversion, mais leur délai de détection des anticorps reste toujours long et leur sensibilité insuffisante. Les deux types de tests (1ères et 2èmes générations) détectent les IgG 45 à 60 jours après l'infection (**Branson BM, 2010**).
- **ELISA de troisième génération**, tests très utilisés en routine (**Sohn AH et coll., 2009**), capables de détecter les IgM et les IgG entre 20 et 25 jours après la contamination (**Owen SM et coll., 2008**). La séroconversion est raccourcie de 5 jours par rapport aux tests de seconde génération. Leurs antigènes sont constitués de protéines virales recombinantes (sous forme très purifiée) ou de peptides synthétiques correspondant à des fragments de protéines virales (**Branson BM, 2010**).

- **ELISA de 4<sup>ème</sup> génération**, proches de la 3<sup>ème</sup> génération par le principe, mais avec des performances améliorées (**Malhotra S et coll., 2013**), Ils sont basés sur des cocktails d'antigènes vitaux et d'anticorps anti-p24 et anti-p26. Ils détectent de ce fait, en même temps Ag et Ac vitaux de classe IgM avec de bonnes sensibilité et spécificité (**Chavez P et coll., 2011**). Leur positivité peut signifier la présence de l'Ag p24 isolé ou associé à l'anticorps, ce qui implique le recours à des tests séparés pour préciser la cause de la réactivité. Ces tests sont capables de détecter l'infection, 5 jours avant l'apparition des premiers anticorps de classe IgM. Ils sont utiles pour le diagnostic de la primo-infection asymptomatique. Les ELISA de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération sont de format sandwich.

L'utilisation d'une combinaison de tests de dépistage et de confirmation (au moins 2) est nécessaire pour poser un diagnostic définitif de l'infection (**Branson BM, 2010**). Cette combinaison consiste à utiliser des tests ELISA ou tests rapides en première intention, associés en cas de séropositivité à un test de confirmation en deuxième intention.

Cependant du fait des performances des tests de détection des anticorps anti-VIH, il n'est pas obligatoire de faire systématiquement recours aux tests confirmatoires (**Delaney KP et coll., 2011** ; **Waheed U et coll., 2013**). Ces tests atteignent une sensibilité voisine de 100% et une spécificité supérieure à 95%.

Plusieurs plateformes entièrement automatisées utilisant des réactifs ELISA de 4<sup>ème</sup> génération pour la détection des anticorps et de l'antigène P24 ont été développées (**Alvarez M et coll., 2012**). C'est le cas des 2 systèmes : ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Abbott) et Elecsys HIV Combi PT (Roche), réduisant de façon considérable la durée de la fenêtre sérologique (**Song EY et coll., 2012**). Même avec les grandes avancées enregistrées en termes de performances des tests permettant une détection de l'infection dans les 10 jours suivant la contamination, il est toujours possible que certains individus ne soient pas dépistés sur cette période. Malgré ces limites, le dépistage de l'infection aigue continuera à jouer un rôle majeur dans la prise en charge précoce et la prévention de l'infection (**Owen SM, 2012**).

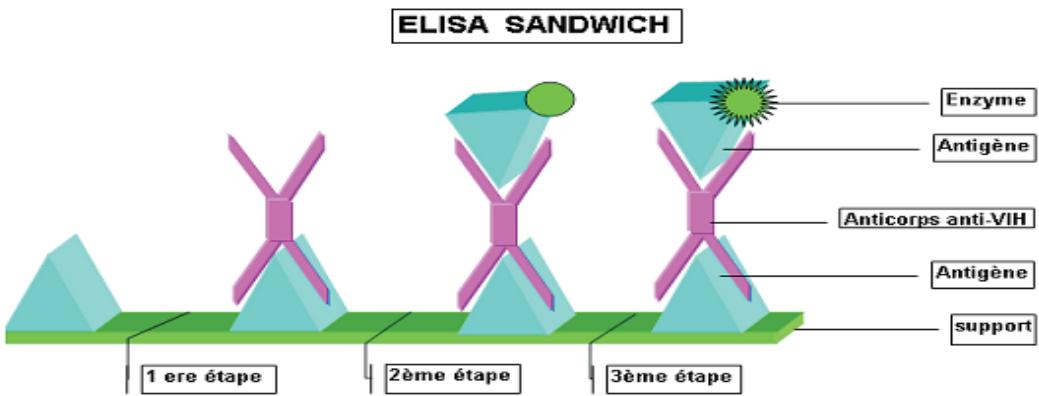


Figure 18 : Principe de l'ELISA Sandwich<sup>19</sup>

#### II.4.1.3.2.1.2 Tests rapides

Généralement, ils sont réalisés en moins de 30 min d'où leur appellation de tests rapides. Leurs antigènes sont de mêmes natures que ceux utilisés pour les tests ELISA. Ils détectent de ce fait les mêmes types d'anticorps que ces derniers : anti VIH-1 groupes M et O et anti- VIH-2 avec une spécificité et une sensibilité comparables (**Amadou A et coll., 2005**). Des tests rapides de 4<sup>ème</sup> génération visant la détection simultanée de l'Ag p24 et des anticorps ont également été développés. Néanmoins, ils présentent une faible sensibilité pour la détection de l'antigène p24 (**Patel P et coll., 2012 ; Brauer M et coll., 2013**) avec des performances optimales pour des charges virales > 7 Log (**Faraoni S et coll., 2013**).

#### Principe général :

Ces tests emploient un support solide sur lesquels sont adsorbés des antigènes recombinants et/ou peptides synthétiques. On ajoute par la suite l'échantillon dilué ou non, puis le conjugué et le substrat respectivement.

Leurs techniques de base sont :

- **L'Agglutination** (sur verre) : de réalisation facile, mais nécessite un œil entraîné pour l'interprétation.
- **L'Immunofiltration** (sur cassette) : leur problème est de nécessiter plusieurs étapes.
- **L'Immunochromatographie** (sur bandelette) : d'utilisation facile et lecture rapide.

<sup>19</sup> [http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/VIROLOGY/OMS\\_2005\\_Le\\_VIH\\_et\\_son\\_diagnostic.pdf](http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/VIROLOGY/OMS_2005_Le_VIH_et_son_diagnostic.pdf) (Consulté le 12/07/ 2013).

Les résultats apparaissent sous forme d'un point (immunofiltration), d'une ligne colorée (immunochromatographie) ou d'une agglutination. La lecture est faite par comparaisons aux contrôles après leur validation.

La stratégie conventionnelle de diagnostic de l'infection par le VIH utilisant les tests de référence (ELISA et Western Blot) est couteuse et peu réalisable dans le contexte des pays à faibles ressources (**Amadou A et coll., 2005**). Les tests rapides sont mieux adaptés aux ressources techniques de ces pays et répondent en plus, au souci de diagnostiquer pour un coût minimal l'infection par le VIH. Judicieusement choisis, ils présentent des résultats comparables aux résultats de tests conventionnels (**Amadou A et coll., 2005 ; Plate DK, 2007 ; Wesolowski LG et coll., 2013**). De réalisation facile et peu contraignante (aucun équipement particulier), plusieurs d'entre eux peuvent être conservés entre 15 et 30°C (**Lyamuya EF et coll., 2009**). Ces avantages ont poussé l'OMS à développer des algorithmes alternatifs pour le sérodiagnostic du VIH basés sur une combinaison de tests de dépistage rapides sans Western Blot, plus adaptés pour les pays à faibles ressources. Le choix d'une stratégie est fonction de l'objectif du ou des tests, de leur sensibilité et spécificité mais également de la prévalence du VIH au sein de la population à tester. Ainsi, 2 stratégies avec une exactitude maximale et un coût minimal ont été développées.<sup>20</sup> Contrairement au pays à faibles ressources, les pays développés utilisent des algorithmes combinant tests ELISA de 4<sup>ème</sup> génération, test Western Blot avec recours en cas de besoin aux tests de biologie moléculaires (PCR ARN ou ADN).<sup>21</sup>

#### **II.4.1.3.2.2 Tests de confirmation**

Ce sont des tests utilisés en 2<sup>ème</sup> intention qui permettent de poser le diagnostic définitif de l'infection par le VIH.

##### **Western Blot (WB)**

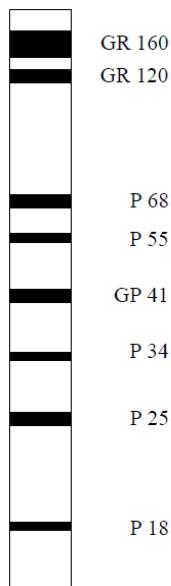
C'est le test de référence pour la confirmation d'une infection à VIH. Il peut être défini comme étant un ELISA sur bandelette (nitrocellulose) où cette dernière est sensibilisée à toutes les protéines constitutives du virus, ce qui implique, une plus grande spécificité. Pour effectuer le test, les bandelettes sont incubées avec les contrôles (positif et négatif) et sérums de patients contenant éventuellement les anticorps-anti VIH.

---

<sup>20</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75206/1/9789241593877\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75206/1/9789241593877_eng.pdf) (Consulté le 18/10/2013).

<sup>21</sup> [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_Morlat\\_2013\\_Mise\\_en\\_ligne.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf) (Consulté le 18/10/2013).

Trois types de western Blot (WB) existent actuellement : le WB anti-HIV1, le WB anti-HIV2 et celui capable de détecter à la fois sur la même bandelette, les deux types de virus. L'interprétation du Western Blot nécessitant du personnel hautement qualifié est très difficile et donne souvent des résultats indéterminés (**Ravanshad M et coll., 2006 ; Uneke CJ et coll., 2007**). Ces autres exigences en équipements et conditions de stockage (chaîne de froid efficace), font que le test est très peu adapté aux pays à faibles ressources (**Uneke CJ et coll., 2007**). On considère positive une recherche sérologique au VIH, lorsque une réactivité aux deux protéines d'enveloppe (*env*) plus une réactivité aux protéines de la région *gag* ou *pol* sont mises en évidence.



**Figure 19 : Résultats d'un Western Blot VIH-1 (Floch JJ, 1990).**

### **Autres tests de confirmation**

Bien que le Western Blot soit le test sérologique de référence pour la confirmation de l'infection à VIH, il existe d'autres méthodes alternatives de confirmation :

#### ***Immuno Analyse en Ligne (LIA) ou Immunoblot : variante du WB***

Cette dernière méthode constitue une alternative au Western Blot (**Schupbach J et coll., 2012**), moins onéreuse et plus facile à interpréter. La discrimination entre les deux types de virus est faite à partir de la même bandelette.

Les autres méthodes, moins utilisées sont :

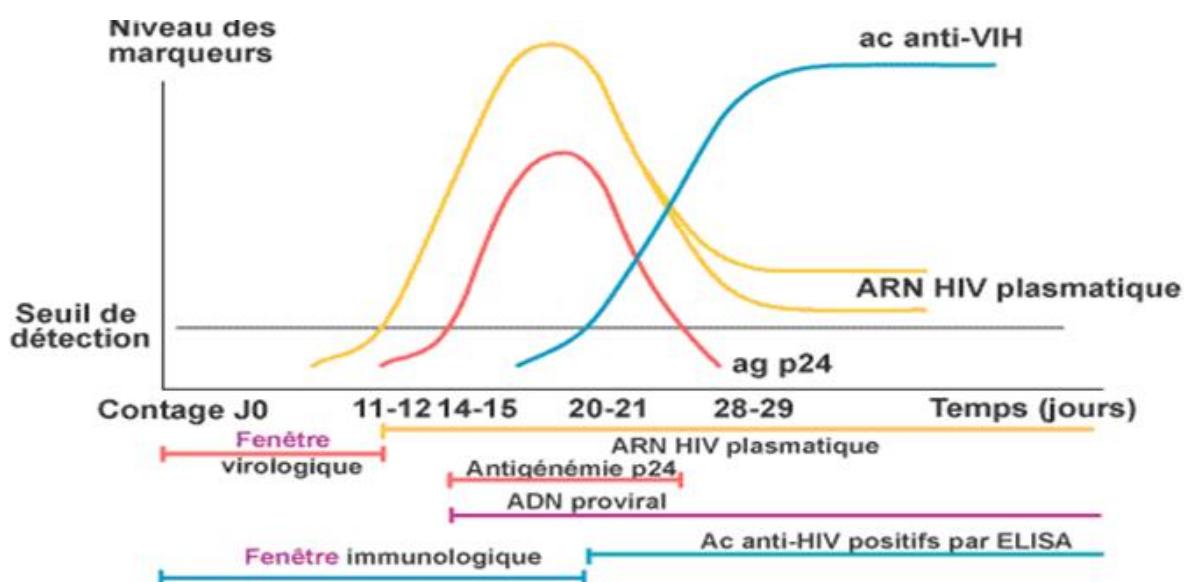
### **Immunofluorescence indirecte (IFA)**

Facile à réaliser, cette technique nécessite pour la lecture, un microscope à fluorescence et un personnel qualifié. Les échantillons positifs donnent une fluorescence sous forme de croissant au niveau du cytoplasme des cellules infectées. La technique ne discrimine pas entre les 2 types de virus. Par ailleurs, en présence de maladies auto-immunes entraînant des fixations d'anticorps à des éléments cellulaires (noyau, mitochondrie), elle peut amener à de fausses lectures.

### **Radio-immunoprecipitation (RIPA)**

Elle est d'utilisation peu courante, limitée à des laboratoires spécialisés. Très sensible et spécifique, son principe se base sur le marquage radioactif. Elle permet de détecter les protéines gp 160 et gp 120, ce qui permet l'affirmation d'une séropositivité.

Avec les résultats d'une étude qui suggère que les personnes séropositives sont capables de capturer de grandes quantités de VIH à la surface de leurs erythrocytes grâce à la présence d'IgG anti-gp160/120, les techniques de diagnostic de l'infection, pourraient connaître une révolution. Avec ces résultats, l'espoir d'un possible diagnostic néonatal très précoce (non basé sur les techniques de biologie moléculaire) et plus accessible aux pays à faibles ressources devient permis (**Garcia MN et coll., 2012**).



**Figure 20 : Cinétiques des marqueurs viraux de la primo-infection due au VIH-1 en absence d'un traitement antirétroviral<sup>22</sup>**

<sup>22</sup>[http://www.unafomec.org/CDRMG/cederom\\_ol/recos/anaes/vihdi\\_00.pdf](http://www.unafomec.org/CDRMG/cederom_ol/recos/anaes/vihdi_00.pdf) (consulté le 12/07/2013).

Selon les recommandations de l'OMS 2013, tout patient présentant un taux de CD4 < 500 cellules/mm<sup>3</sup> de sang doit être mis sous traitement antirétroviral (TARV)<sup>23</sup> et bénéficier d'un suivi (ou monitoring) biologique. La numération des CD4 permet d'apprécier la restauration immunitaire alors que la mesure de la charge virale permet le contrôle de la réplication virale. Cette dernière est le seul marqueur permettant d'évaluer l'efficacité du TARV. Idéalement, elle est effectuée une fois tous les 6 mois. Vu son importance, l'OMS recommande aux pays à faibles ressources de l'inclure dans le suivi des patients sous ARV<sup>21</sup>.

#### **II.4.2 Monitoring virologique**

Conformément aux nouvelles recommandations de l'OMS pour le traitement antirétroviral (ART), la charge virale occupe une place importante pour la détection précoce de l'échec virologique dans le but d'évaluer l'efficacité du traitement antirétroviral<sup>24</sup>. L'objectif principal de ce traitement est d'empêcher la progression vers le stade SIDA et le décès par maintien ou restauration d'un taux de CD4 > 500 cellules/mm<sup>3</sup>. Pour atteindre cet objectif, le traitement ARV doit rendre la charge virale plasmatique (CV) indétectable (<50 copies/ml), ce qui favorise la restauration immunitaire et réduit le risque de sélection de virus résistants. La mesure de la charge virale plasmatique est un marqueur virologique prédictif de l'infection à VIH et d'évaluation de l'efficacité du traitement antirétroviral qui permet indirectement d'évaluer l'observance. Les techniques commerciales de quantification virale ont beaucoup évolué du point de vue de la performance avec l'avènement de l'amplification en temps réel, avec des plateformes de plus en plus automatisées (**Alvarez M et coll., 2012**).

Six trousse commerciales sont actuellement disponibles pour la quantification de la charge virale plasmatique du VIH-1 : Cobas TaqMan® (Roche Molecular Diagnostics), Abbott Real Time HIV-1® (Abbott Diagnostics), NucliSens EasyQ v1.2® (Biomérieux), Generic HIV Charge virale® (Biocentric), Versant® HIV-1 RNA v3.0 (Siemens) et Versant HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) (**Troppan KT et coll, 2009 ; Church D et coll., 2011 ; Mouinga-Ondeme A et coll., 2013**). Les capacités de ces tests à quantifier la charge virale plasmatique d'une infection due à un sous-type non-B font l'objet de nombreuses études de comparaison/évaluation dont les résultats ont abouti à des progrès. Ceci a permis une amélioration de la sensibilité de ces tests afin de quantifier tous les sous-types du VIH-1, aussi bien sur des échantillons de plasma que sur des spots de sang séchés sur papier buvard (**Berger A et coll., 2005 ; Pan P et coll., 2007 ; Choi JY et coll., 2009 ; Garrido C et coll., 2009 ; Rouet F et coll., 2010 ; Karasi JC et coll., 2011**).

<sup>23</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 12/10/2013).

<sup>24</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 12/10/2013).

Les technologies disponibles à ce jour capables de quantifier efficacement les souches de VIH du groupe O sont celles de Abbott real Time HIV-1 et CobasTaqMan (v2.0) de Roche (**Swanson P et coll., 2007 ; Sizmann D et coll., 2010**). Cependant, il a été développé une technique maison en temps réel capable de quantifier les charges virales des SIVcpz, SIVgor et les 4 groupes (M, N, O et P) du VIH-1(**Etienne L et coll., 2013**).

Enfin, à l'image du suivi immunologique, des techniques commerciales « point of care » de quantification de la charge virale adaptées au pays à faibles ressources dont les résultats d'évaluation préliminaires sont prometteurs, sont en développement (**Reid SD et coll., 2013**).

En ce qui concerne le VIH-2, la technique NucliSens EasyQ (Biomerieux) est la seule technique qui arrive à quantifier le groupe A du VIH-2 (**Rodés B et coll., 2007**). Néanmoins, une étude portant sur l'utilisation d'amorces et d'une sonde spécifiques contournant la diversité du VIH-2 ciblant la région LTR, confirme (en plus du VIH-2 groupe A) une possible quantification en temps réel de la charge virale du VIH-2 groupe B (**Delarue S et coll., 2013**).

Vu la grande diversité du VIH et son caractère dynamique, l'assurance que les tests détectent tous les variants circulants, y compris ceux nouveaux, constitue un défi (**Hemelaar J, 2012**). De ce fait, l'évaluation continue et l'assurance qualité des tests de quantification virale sont nécessaires pour éviter la non ou mauvaise détection qui peuvent engendrer des valeurs de charge virale faibles ou erronées, pouvant avoir des répercussions sur le traitement et la prise en charge de l'infection (**Greig J et coll., 2011**)

La grande caractéristique du VIH est sa grande diversité génétique. Une fois dans l'organisme, le VIH subit une transcription inverse de son génome composé d'ARN en ADN grâce à la transcriptase inverse (TI) qui génère beaucoup d'erreurs lors de la transcription. En présence d'une réPLICATION virale élevée caractéristique des rétrovirus, cette absence de fonction réparatrice de la TI conduit à de fréquentes mutations aléatoires avec possibilité de recombinaisons génétiques à l'origine de l'émergence de souches virales comportant des différences au niveau de leur génome.

## **Chapitre III : Diversité génétique du VIH-1 et ses conséquences**

### **III.1 Diversité génétique du VIH-1**

Une des caractéristiques majeures des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est leur très grande variabilité génétique. Cette variabilité est liée à un taux de réPLICATION virale très élevé en absence d'une fonction réparatrice de la RT, combiné à la survenue fréquente de mutations aléatoires et de recombinaisons génétiques (**Robertson DL et coll., 1995 ; Rambaut A et coll., 2004**). C'est au cours de la rétrotranscription du génome viral que la diversité génétique s'exprime le plus. L'environnement cellulaire a un effet majeur sur la rétrotranscription. Lors de cette dernière, le taux de recombinaisons et les mutations sont déterminés par la présence ou non de protéines cellulaires et virales spécifiques et par l'abondance des substrats cellulaires (**Smyth RP et coll., 2012**).

La diversité génétique constitue la base de la classification du virus. C'est ainsi que les deux types de VIH actuellement connus sont classés en groupes, sous-types, sous-sous-types et enfin formes recombinantes uniques/circulantes. La variabilité génétique et l'apparition de nouveaux variants du VIH constituent un phénomène dynamique. Il s'agit d'un processus d'évolution, dont les mécanismes sont semblables à ceux qui expliquent l'évolution de toute espèce vivante. La spécificité du VIH réside dans le fait que cette évolution est très impressionnante par sa rapidité, ce qui explique le grand nombre de variants actuels.

#### **III.1.1 Origines de la variabilité génétique**

Trois facteurs peuvent rendre compte de l'évolution de n'importe quelle partie d'un génome (viral ou cellulaire) : le taux de mutations spontanées, le nombre de générations produites par unité de temps et enfin les pressions de sélection positives et négatives.

##### **III.1.1.1 Mutations aléatoires fréquentes**

Le VIH se réplique à une vitesse très élevée en présence de la Transcriptase Inverse caractérisée par une faible fidélité, ce qui se traduit par un taux de mutations très important. Cependant, La transcriptase inverse est le principal facteur générateur de variabilité du génome viral du fait de l'absence d'une activité 3'-5' exonucléasique. Elle est de ce fait dépourvue de système de correction des erreurs de copie qui surviennent au cours de la synthèse de l'ADNc (**Malim MH et Emerman M, 2001 ; Bakhanashvili M et coll., 2005**). Ces erreurs fréquentes, sont estimées à une par 1700 à 10000 nucléotides produits. Ceci se traduit approximativement par 1 à 10 mutations par cycle de réPLICATION virale, la taille du génome étant de 9.2kb (**Preston BD et coll., 1988 ; Roberts JD et coll., 1988**).

La vitesse de réPLICATION du génome est un facteur amplificateur de la survenue de ces mutations. En effet, ce sont environ 10 000 virions qui sont produits par jour par chaque virion infectant une cellule et tous les deux jours,  $10^9$  à  $10^{10}$  virions sont renouvelés (**Wei X et coll., 1995**). Ainsi, suite à l'infection d'un individu, des essaims de nouveaux virus contenant des séquences génomiques différentes co-existent et sont continuellement produits à l'intérieur d'un même individu. Les souches qui sont les plus compétitives à un moment donné domineront au sein de la population virale globale. Chez le même individu infecté, les variants peuvent diverger d'environ 1 à 5%. On parle de variabilité intra-individuelle, intrinsèque ou « quasi espèce ». La variabilité contribue également à la génération de variants viraux inter-individuels plus éloignés génétiquement. Cette variabilité du génome viral touche tous ses gènes, mais elle n'est pas la même pour tous les gènes. C'est ainsi que le gène *env* est le plus variable et le gène *pol* est le plus conservé (**Barbour JD et Grant RM, 2005 ; Santos AF et Soares MA, 2010 ; Twigg Arrildit K et coll., 2012**).

### III.1.1.2 Les recombinaisons génétiques

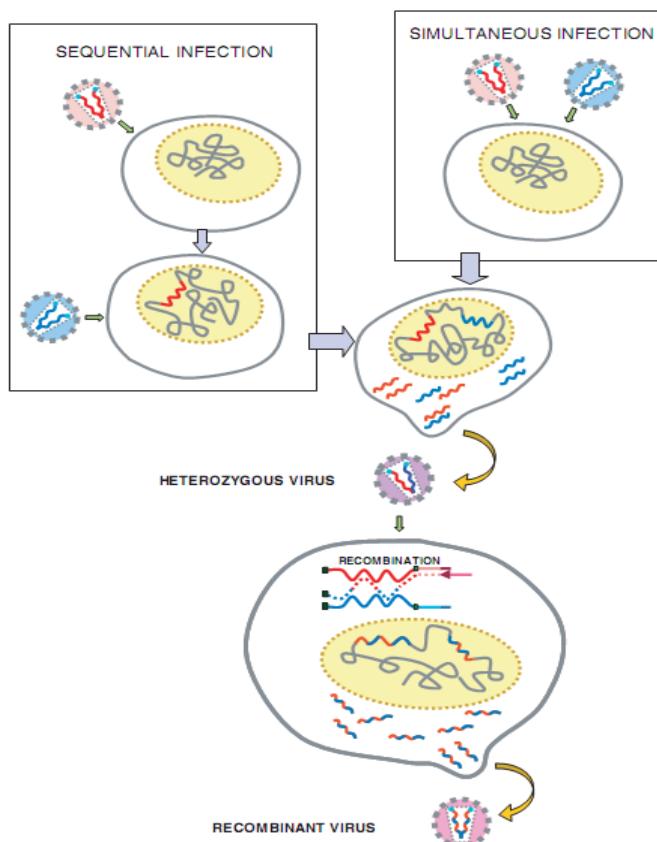
La recombinaison génétique est une propriété fondamentale pour l'évolution. Elle s'effectue lors de la réPLICATION d'un virus et peut se faire entre des virus d'espèces différentes : recombinaison hétérologue ou de même espèce : recombinaison homologue (**Simon-Lorière E et coll., 2009**).

En raison de sa nature diploïde, le VIH peut augmenter son potentiel de succès évolutif par recombinaison. Quand une cellule est infectée avec 2 virus génétiquement distincts lors d'une surinfection, une recombinaison peut se produire. Elle survient pendant la rétrotranscription, lors des phénomènes de sauts de brins effectués par la TI avec production d'une séquence d'ADN néo-synthétisée qui est un recombinant entre les deux génomes parentaux. Le nouveau virus ainsi produit est un virus mosaïque constitué de séquences provenant de plusieurs génomes. Ce phénomène de recombinaison entre 2 souches distinctes peut se produire dès les 2 premières semaines d'infection (**Wooley DP et coll., 1997**) et le VIH subirait 2 à 3 événements de recombinaison par génome et par cycle de réPLICATION (**Jetzt AE et coll., 2000**). La recombinaison peut intéresser des virus d'un même sous-type (recombinaison intra sous-type) (**Yang OO et coll., 2005**), mais elle est plus évidente quand elle se produit entre sous-types différents (recombinaison inter sous-types) (**Ward MJ et coll., 2013**).

La surinfection à l'origine de la recombinaison peut résulter de l'adoption simultanée de virus multiples au cours d'un événement unique de transmission (co-infection), ou d'un passage séquentiel des virus suite à de multiples événements de transmission (superinfection) (**Ramos A et coll., 2002 ; Smith DM et coll., 2005**).

L'existence de virus recombinants est la preuve systématique d'une surinfection (**Blackard JT et coll., 2002**). Cependant, l'impact le plus largement remarqué de la recombinaison sur la diversité génétique du VIH, est l'apparition fréquente et naturelle des inter-sous-types recombinants dans des parties du monde où plusieurs sous-types co-circulent (**Malim M H et coll., 2001**).

La proportion des surinfections au sein d'une population donnée dans un intervalle de temps précis est inconnue. Cependant, la proportion élevée de cas de VIH attribuables à des virus recombinants dans le monde et la forte probabilité d'événements de recombinaison dans chaque cycle de réPLICATION, montrent que ce mécanisme est un moyen efficace et une méthode rapide utilisée par le virus pour évoluer. Les recombinaisons génétiques peuvent modifier le tropisme cellulaire, la pathogénicité virale, la sensibilité aux médicaments antirétroviraux, la précision des tests courants de diagnostic sérologique et les tests de biologie moléculaire, ainsi que la progression de la maladie (**Blackard JT et coll., 2002**).



**Figure 21 : Processus de recombinaison virale (Nàjera R et coll., 2002).**

La recombinaison est observée lorsque deux molécules d'ARN génomique génétiquement divergentes sont présentes dans la même particule virale après co-infection (infection simultanée) ou surinfection (2 infections séquentielles). On assiste alors à l'intégration dans le génome de la cellule infectée des génomes de 2 virus parentaux. Le progénie viral sera ainsi constitué de virions hétérozygotes et homozygotes. Avec l'infection d'une deuxième cellule par un virion hétérozygote, on peut lors de la transcription inverse, obtenir un provirus chimérique menant à la production de particules virales recombinantes.

### **III.1.1.3 Les pressions de sélection**

Les pressions de sélection sont de deux types. Elles peuvent être négatives ou positives. Les pressions de sélection négatives sont responsables de mutations synonymes ou silencieuses, qui n'entraînent aucun changement de l'acide aminé ou de ses propriétés chimiques. Ce type de mutation dit conformationnel et structurel est le plus souvent rencontré sur les gènes sensibles de la particule virale tel que le gène *pol* et le gène *gag*, qui sont les gènes du VIH les plus conservés codant respectivement les enzymes virales et les protéines de structure (**Barbour JD et Grant RM, 2005**). Par opposition, les pressions de sélection positives sont responsables de mutations non-synonymes favorisant les substitutions d'acide aminé. Ces mutations touchent de façon très marquée le gène *env* codant les protéines d'enveloppe, et plus particulièrement, la boucle V3, partie la plus variable de la gp120 (**Kuiken CL et coll., 1993**). Les mutations positives sont induites en grande partie par le système immunitaire avec des mutations permettant notamment aux protéines de l'enveloppe d'échapper à l'action du système immunitaire. Toutes ces pressions qui s'exercent sur le génome entraînent l'accumulation de mutations qui sont le plus souvent fatales pour le virus avec la production de virions non viables, amenés à disparaître car incapables de se répliquer correctement. Cependant, cette importante disparition de virions est compensée par le taux élevé de réPLICATION virale. Le VIH est donc soumis à une sélection naturelle qui ne laisse persister que les virions les plus résistants aux attaques du système immunitaire. La conséquence en est, que les virions présents dans l'organisme, sont ceux les plus résistants et adaptés à leur milieu.

Le traitement antirétroviral est également un puissant inducteur de pressions de sélections positives. Il détruit les virus sensibles aux molécules antirétrovirales à l'avantage de l'émergence de variants résistants à ces mêmes molécules. C'est pour contrer cette adaptation que les multithérapies visent à «attaquer» le VIH sur plusieurs fronts à la fois et ainsi limiter au maximum les possibilités du virus de s'adapter à son milieu.

### **III.1.1.4 Origines multiples**

La multiplicité temporelle des passages des SIVcpz à l'Homme est la raison de l'existence des différents groupes du VIH-1. Les chimpanzés et les gorilles sont les uniques primates non humains connus pour héberger des virus proches du VIH-1. Les analyses phylogénétiques ont montré que les gorilles auraient acquis les SIVgor à partir des chimpanzés et que les virus de la lignée SIVcpz/SIVgor auraient été transmis à l'homme au cours d'au moins 4 événements de franchissement de la barrière d'espèce.

Le VIH-1 est ainsi divisé en 4 groupes (**M, N, O** et **P**) dérivant chacun d'une introduction distincte d'un SIVcpz/SIVgor dans la population humaine (**Neel C et coll., 2010 ; Plantier JC et coll., 2009 ; Van Heuverswyn F et coll., 2006 Gao ; F et coll., 1999**). Il en est de même pour le VIH-2, dont l'ancêtre est le SIVsmm. Le VIH-2 proviendrait ainsi de 8 transmissions indépendantes des virus de la lignée SIVsmm qui ont donné naissance aux 8 groupes du virus : **A, B, C, D, E, F, G et H (Damond F et coll., 2004)**.

Une nouvelle transmission de SIV serait à l'origine d'une lignée du VIH-2 qui impliquerait un nouveau groupe différent des groupes (A à H) précédemment rapportés. Etroitement liées aux souches SIVsmm, elle a été mis en évidence sur la base de résultats de travaux de séquençage portant sur des gènes partiels de *gag* et *pol*, (**Ayoub A et coll., 2013**).

Le VIH-1 groupe O (Outlier) est le groupe du VIH le plus divergent. Des études suggèrent qu'il aurait pour origine des SIV infectant les gorilles (SIVgor) (**Van Heuverswyn F et coll., 2006**). Le SIVgor étant proche du SIVcpz, il serait possible que les gorilles aient été des réservoirs intermédiaires du VIH-1 groupe O (**Takehisa J et coll., 2009**). L'épidémie à HIV-1 groupe O est restreinte à la partie ouest de l'Afrique centrale avec une prévalence stable/ou en baisse au Cameroun (**Ayoub A et coll., 2001; Brennan CA et coll., 2008**). Quelques cas sont décrits au gabon (**Liegeois F et coll., 2013**). Le groupe N a été identifié en 1998 (**Simon F et coll., 1998**) et il aurait pour origine une lignée de SIVcpz retrouvée chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* de la partie centrale du Sud Cameroun (**Keele BF et coll., 2006**). Moins de 50 variants du groupe N, tous provenant du Cameroun ont été identifiés (**Ayoub A et coll., 2000 ; Roques P et coll., 2004 ; Santos AF et Soares MA, 2010, Vallari A et coll., 2010**). En 2011, un cas de VIH groupe N fut diagnostiqué en France, chez un patient qui avait séjourné au Togo, ce qui suggère que les virus du groupe-N sont actuellement en circulation en dehors du Cameroun (**Delaugerre C et coll., 2011**).

Un dernier groupe nommé P, a été décrit pour la première fois en 2009, chez une femme d'origine camerounaise (**Plantier JC et coll., 2009**). Ce groupe serait proche du SIVgor sans évidence de recombinaison avec les autres groupes du VIH-1. A ce jour, 2 cas ont été identifiés confirmant la circulation de ce variant qui pourrait exister à l'état latent au Cameroun (**Plantier JC et coll., 2009 ; Vallari A et coll., 2011**). Malgré sa rareté, le groupe P montre des signes d'adaptation à l'homme (**Vallari A et coll., 2011**).

Le VIH-1 groupe M est le seul responsable de la pandémie actuelle. Il représente plus de 95% des cas d'infection par le VIH répertoriés dans le monde (**Santos AF et Soares MA, 2010**). Avec une origine clairement établie, il dériverait d'un SIVcpzPtt des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* du sud-est du Cameroun (**Keele BF et coll., 2006**). On suppose que de son origine géographique, le Sud-Est du Cameroun, le groupe M aurait probablement été transmis localement avant d'atteindre la République Démocratique du Congo à partir duquel il se serait propagé dans le reste du monde (**Parris GE, 2007**).

**Tableau I : Caractéristiques des différents types et groupes du VIH : Santos AF et Soares MA, 2010 ; Keele BF et coll., 2006 ; Peeters M et Chaix ML, 2013, Ayouba A et coll., 2013).**

Groupe	Origine	% d'isolats	Epidémiologie	Remarques
<b>HIV-1</b>				
M	SIVcpz	259 687 (98.2%)	Tous les continents sauf l'Antarctique	Responsable de la pandémie
N	SIVcpz	22 (<0.001%)	Uniquement au Cameroun	
O	Proche de SIVgor	1095 (0.4%)	Essentiellement en Afrique de l'Ouest et du Centre	Naturellement résistant aux INNTI
P	SIVgor	2 cas	Inconnue	Décrit en 2009 (chez camerounaise)
<b>HIV-2</b>				
A-H	SIVsmm	3593 (1.4%)	Principalement en Afrique de l'ouest et du centre/ Cas sporadiques ailleurs	Plus lente progression vers le stade SIDA, naturellement résistant aux INNRT Probable nouveau groupe (en 2013)
A			Sénégal/ G Bissau	
B			Côte d'Ivoire	
C-H			-	

### **III.1.2 Diversité génétique du VIH-1 groupe M**

Dans le début des années 1990, le séquençage et l'alignement à partir des gènes *gag* de 70 souches de VIH-1 de plusieurs zones géographiques, a permis pour la première fois d'établir l'existence de clades génétiques bien définies au sein du VIH-1 M. C'est ainsi que les sous-types A, B, C, D, E et F ont été reconnus en 1993 (**Louwagie J et coll., 1993**). Les sous-types G et H ont été caractérisés en 1994 en Afrique centrale (**Janssens W et coll., 1994**). Plus tard ont été décrits respectivement en 1995, 1999 et 2000, les sous types, I (**Kostrikis LG et coll., 1995**), J (**Laukkanen T et coll., 1999**) et K (**Triques K et coll., 2000**).

Les premiers cas de recombinaison identifié a été le sous-type E qui se regroupait dans le cluster du sous-type A sur l'analyse du gène *gag*, alors qu'il formait dans l'analyse du gène *env* et certains gènes accessoires (vif, vpr et nef), un cluster unique particulier. Il s'est avéré que le sous-type était le résultat d'une recombinaison entre le sous-type A et une autre souche (**McCutchan FE et coll., 1996**). Du fait que, aucun sous-type E pur n'a été trouvé à ce jour, le sous type a été rebaptisé CRF01\_AE pour refléter sa nature. Cependant, il aurait été suggéré que ce CRF 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* (**Anderson JP et coll., 2000**). Depuis, ce premier CRF, de nombreux autres recombinants ont été identifiés et de la même manière, le sous-type I, considéré initialement comme sous-type pur, s'est révélé comme étant un recombinant complexe entre les sous-types A, G et I (**Nasioulas G et coll., 1999**).

La complexité de la diversité génétique posait un problème de classification, rendu plus compliquée avec les formes recombinantes. Pour plus de fiabilité de la classification des séquences partielles de VIH, un système standard de nomenclature et de répartition des sous-types a été établi depuis 1999.<sup>25</sup> Selon ce consensus, un nouveau sous-type/CRF doit être « à peu près équidistant » des sous-types précédemment définis dans toutes les régions du génome. Par ailleurs, la désignation d'un nouveau sous-type/CRF exige trois séquences, de préférence des génomes complets (à défaut, deux complets et un partiel), provenant de patients, ne présentant aucun lien épidémiologique. D'autre part, les sous-sous-types décrivent deux lignées distinctes étroitement liées à un sous-type existant pour être défini comme tels. De même, au moins trois souches ne présentant aucun lien épidémiologique doivent être identifiées pour justifier une nouvelle classification en sous-sous-type (**Roberston D et coll., 1999**).

---

<sup>25</sup><http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2012/sequence2012.pdf> (Consulté le, 19/08/2013).

### **III.1.2.1 Sous types du VIH-1**

Depuis 1992, les analyses phylogénétiques des séquences des gènes *env* et *gag* ont permis de classer les virus du groupe M en sous-types. La désignation des sous-types a été un marqueur moléculaire puissant pour suivre l'évolution de l'épidémie du VIH-1. Des efforts considérables pour collecter et caractériser les isolats du VIH-1 dans le monde entier ont permis d'avoir un aperçu de la distribution des sous-types et CRF.

Les sous-types du groupe M sont équidistants les uns des autres dans une distribution phylogénétique radiale à partir d'un ancêtre commun. Ils sont définis sur la base des 3 critères suivants : **i)** au moins deux isolats séquencés sur toute la longueur de leur génome, **ii)** ces 2 isolats doivent se ressembler l'un et l'autre sur l'ensemble du génome et ne pas ressembler à d'autres sous-types existants, **iii)** ils doivent enfin être retrouvés chez au moins trois individus qui n'ont aucun lien épidémiologique entre-eux.<sup>26</sup> Ainsi, selon la classification actuelle, le groupe M du VIH-1 comprend neuf différents sous-types «purs» ou formes non-recombinantes (A-D, F-H, J et K). La divergence des nucléotides entre les sous-types du VIH-1 est de 25-30% 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 AF et Soares MA, 2010**). Certains sous-types sont en plus, divisés en sous-groupes libellés sous-sous-types. Les différences génétiques entre les sous-sous-types sont d'environ 7% au niveau du gène *pol*. En se basant sur ce critère, uniquement deux sous-types sont subdivisés en sous-sous-types : ce sont respectivement le sous-type A subdivisé en 6 sous-sous types (A1 à A6) et le sous-type F subdivisé en deux sous-sous types (F1 et F2) (**Bartolo I et coll., 2009 ; Gao F et coll., 2001 ; Meloni ST et coll., 2004 ; Triques K et coll., 1999 ; Vidal N et coll., 2009**).

### **III.1.2.2 Formes recombinantes circulantes (CRFs)**

La recombinaison joue un rôle majeur dans l'épidémiologie mondiale du VIH. Bien que la prévalence des formes recombinantes soit de 22% à travers le monde (**Lihana RW et coll., 2012**), cette prévalence varie considérablement en fonction des régions géographiques. C'est dans celles présentant une grande diversité de sous-types, telle que l'Afrique subsaharienne, qu'on a le plus grand taux de recombinaison en lien avec deux facteurs : la présence sur le continent de tous les sous-types et les phénomènes courants de co-infection et de superinfection avec deux ou plusieurs souches virales (**Li WH et coll., 1988**). A l'opposé, d'autres zones comme l'Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada) où circulent un nombre limité de sous-types ont un faible taux de recombinants (**Kijak GH et coll., 2005**).

---

<sup>26</sup> <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2012/sequence2012.pdf> (Consulté le 19/08/2013).

Les isolats de recombinants inter-sous-types sont divisés en deux catégories : ceux présentant les mêmes points de recombinaison inter-sous-typique, retrouvés dans une population chez au moins trois personnes sans lien épidémiologique. Ils sont appelés forme recombinante circulante (ou CRF). Par opposition, ceux isolés chez moins de 3 individus sont appelés forme recombinante unique (ou URF). Les URF ont un impact mineur sur l'épidémie mondiale (**Janssens W et coll., 1997**). A ce jour, 61 CRFs ont été caractérisés.<sup>27</sup>

### **III.1.3 Répartition mondiale des sous-types et CRFs du VIH-1**

La distribution mondiale du VIH-1 et prévalence régionale de variants spécifiques du virus sont très hétérogènes (**Cf. Figure 24**).

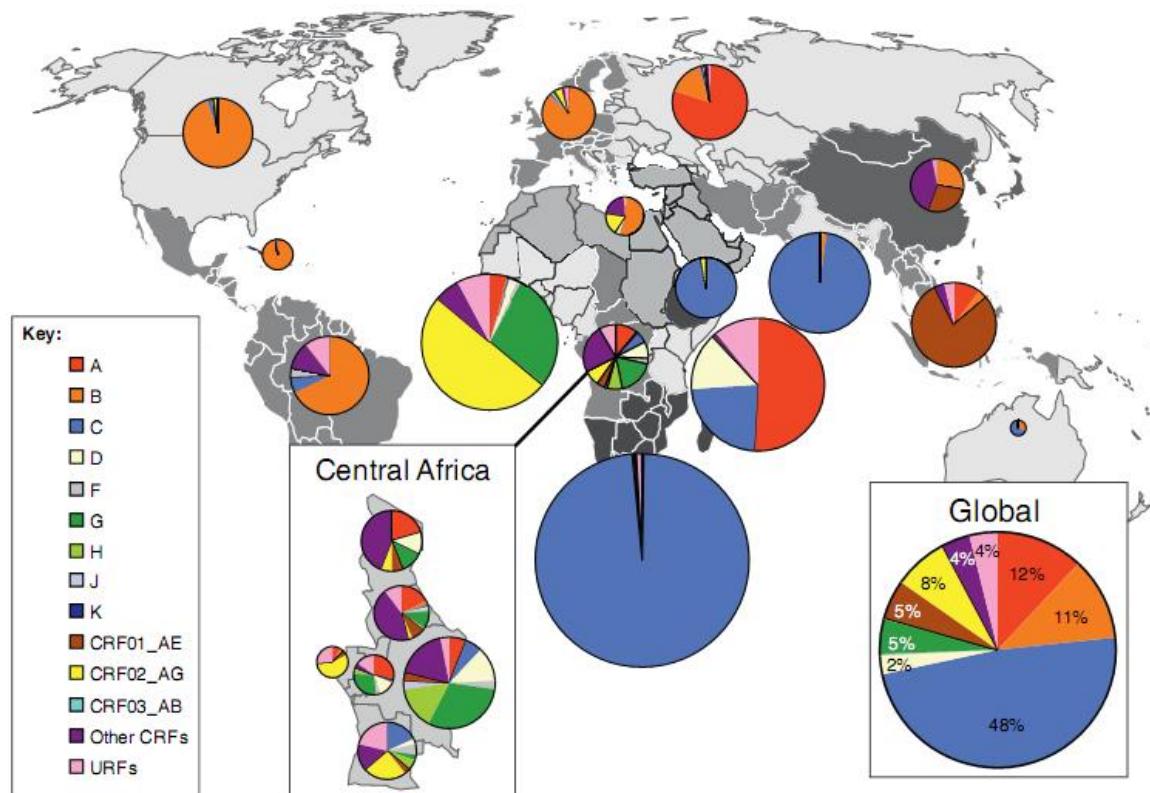
#### **III.1.3.1 Formes pures**

La forme pure la plus répandue de VIH-1 est le sous-type C responsable d'environ la moitié (entre 48% et 50%) des infections mondiales (**Ramirez BC et coll., 2008 ; Hemelaar J et coll., 2012**). Elle est suivie du sous-type A qui représente 12% environ des infections mondiales. Parmi le sous-type A, le sous-sous-type A1 est le plus répandu, alors que les sous-sous-types A2 et A3 se trouvent principalement en Afrique et rarement en Europe.

Le sous-type B avec 11% du total des infections, est le variant qui a le plus diffusé et prédomine dans les pays développés tels que les Etats-Unis, les pays de l'Europe occidentale, le Japon et l'Australie. Le sous type G, représentant 5% des infections mondiales est principalement présent en Afrique Centrale et de l'Ouest. Le sous type D avec 2% des infections est plus présent en Afrique de l'Est mais enregistre de nouvelles infections en Afrique Centrale et de l'Ouest. Le sous-type F est largement et uniformément réparti dans le monde entier, tandis que les sous-types H, J et K se trouvent surtout en Afrique de l'Ouest, du Centre et du Sud. Ces sous types groupés représentent moins de 1% des infections mondiales (**Hemelaar J et coll., 2012 ; Lihana RW et coll., 2012 ; Peeters M et coll., 2013**).

---

<sup>27</sup> <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 04/12/2013).



**Figure 22 : distribution géographique mondiale des formes génétiques du VIH-1 (Hemelaar J et coll., 2012).** Le camembert avec les pourcentages, représente les proportions relatives de chacun des sous-types/CRF du VIH-1 groupe M identifiés à travers le monde.

### III.1.3.2 Formes recombinantes circulantes

Elles représentent à peu près 20% des infections mondiales (Hemelaar J et coll., 2011). Certains CRFs comme le CRF02\_AG et le CRF06\_cpx en Afrique de l'Ouest et le CRF01\_AE ont un grand impact sur les épidémies locales de VIH/SIDA (Ramirez BC et coll., 2008 ; Hemelaar J et coll., 2011 ; Peeters M et coll., 2013). Des recombinants diverses impliquant ces CRF ont été également décrits, bien qu'à de faibles proportions, en Afrique de l'Ouest ; c'est le cas du CRF02\_AG/CRF06\_cpx au Niger (Mamadou S et coll., 2003) et du CRF02\_AG/CRF09\_cpx en Côte d'Ivoire (Toni T et coll., 2005).

En définitif, l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 est un processus dynamique. Le sous-type C qui serait entré au Brésil autours des années 80 très probablement à partir du Burundi (Santos AF et coll., 2007 ; Bello G et coll., 2008), a connu une nette augmentation dans le pays (Alcade R et coll., 2012). Il représente actuellement plus de 50% des infections dans la région sud du Brésil (Gräf T et coll., 2011 ; Silveira J et coll., 2012).

De même, dans la partie australe et Orientale de l'Afrique, le sous-type C surclasse tous les autres sous-types pratiquement en extinction, tels que les sous-types B et D (**Delatorre EO et Bello G, 2012 ; Lihana RW et coll., 2012 ; Jacobs GB et coll., 2009 ; Loxton AG et coll., 2005 ; Williamson C et coll., 1995**).

## **Asie**

L'épidémie en Asie est largement dominée par les sous-types B, C et le CRF01-AE (**Oyomopito RA et coll., 2012 ; Merati TP et coll., 2012**). Le continent connaît une évolution de sa diversité génétique avec introduction et importance de nouveaux variants, tels que les CRF07\_BC et CRF08\_BC en Chine (**Yang R et coll., 2003 ; Li L et coll., 2010 ; Meng Z et coll., 2012**) et le CRF33\_01B, en Malaisie (**Chow WZ et coll., 2013 ; Tee KK et coll., 2006**). Une très grande diversité génétique a été rapportée en Hong Kong (**Chen JHK et coll., 2010**).

## **Europe et Russie**

Le sous-type B est le sous-type prédominant en Europe de l'Ouest et du centre (**De Luca A et coll., 2013 ; Stanojevic M et coll., 2012**). Cependant, on assiste à l'introduction d'autres souches non-B attribuable à l'immigration (**Yerba G et coll., 2012**). En France il a été rapporté une prévalence de 38% du CRF02\_AG (**Javaugue FC et coll., 2012**). Dans les pays de l'Europe de l'Est comme la Russie, le sous-type A est largement dominant (**Thomson MM et coll., 2009 ; Masharsky AE et coll., 2010**) alors qu'en République Tchèque, c'est le sous-type B qui est majoritaire (**Linka M et coll., 2008**).

## **Les Amériques**

Les sous-types B et F ainsi que leurs recombinants dominent l'épidémie en Amérique centrale et du Sud (**Veras NM et coll., 2007 ; Aulicino PC et coll., 2012 ; Murillo W et coll., 2013**). En Amérique du Nord, le sous-type B reste majoritaire (**Pyne MT et coll., 2013**). On assiste cependant à l'introduction de sous-types non-B au niveau de ces régions (**Wheeler WH et coll., 2010 ; Pyne MT et coll., 2013**)

## **Océanie et Australie**

Le sous type C est majoritaire au niveau de plusieurs régions de l'Océanie, (**Peeters M et coll., 2013**). Cependant, le sous-type B prédomine en Australie, mais l'immigration va probablement faciliter la propagation de nouveaux sous-types dans la population générale.

En effet, une importante étude menée à Victoria a révélé 6 sous types non-B (majoritairement le sous-type C), 6 CRFs dont le CRF01\_AE fréquent en Asie, le CRF02\_AG, typique de l'Afrique sub-saharienne et 12 URF (**Chibo D et coll., 2012**).

## **Afrique**

L'Afrique sub-saharienne présente la plus grande diversité génétique des souches du VIH circulant au monde (**Ramirez BC et coll., 2008 ; Hemelaar J et coll., 2011 ; Lihana RW, 2012**). La région d'Afrique où cette grande diversité est la plus accentuée est l'Afrique centrale (**Ward MJ et coll., 2013**). Tous les sous-types connus, de nombreux CRFs et une bonne variété de recombinants uniques y circulent (**Janssens W et coll., 1997 ; Vidal N et coll., 2000 ; Djoko CF et coll., 2011**).

Au Cameroun, où tous les sous types du groupe M, les souches, M, N et P sont représentés, l'épidémie est très dynamique avec l'émergence de nouveaux variants, notamment les formes recombinantes uniques et recombinantes secondes générations (**Ragupathy V et coll., 2011 ; Zhao J et coll., 2012**).

Le CRF02\_AG représenterait jusqu'à 65% des échantillons positifs au Cameroun et dans les pays avoisinants (**Montavon C et coll., 2000 ; Pandrea I et coll., 2002, Ragupathy V et coll., 2011 ; Aghokeng AF et coll., 2013**) à l'exclusion de la République Démocratique du Congo (RDC) où la diversité du VIH-1 dépasse celle de tous les autres pays combinés (**Vidal N et coll., 2000 ; Kita K et coll., 2004 ; Yang C et coll., 2005 ; Djoko CF et coll., 2011 ; Peeters M et Chaix ML, 2013**). **La figure n°25**, illustre en partie la grande diversité génétique du VIH-1 en RDC. Cette diversité du VIH-1 en Afrique centrale reste un processus dynamique.

Le sous-type le plus concerné par ce dynamisme est le sous-type C. Ne représentant que 2,1% en 1997 (**Vidal N et coll., 2005**), il pouvait atteindre 13,8% en 2007 (**Djoko CF et coll., 2011**).

L'Afrique de l'Ouest présente un modèle épidémiologique similaire à celui de l'Afrique centrale avec une prédominance du CRF02\_AG. La prévalence du sous-type varierait de 40,5 % au Nigéria (**Chaplin B et coll., 2011**), 56,3% au Niger (**Mamadou S et coll., 2011**), 64% et 66,7% respectivement au Sénégal et au Mali (**Diop-Ndiaye A et coll., 2010 ; Maiga AI et coll., 2013**) et pouvait atteindre 83% et 89% respectivement en Côte d'Ivoire et en Guinée (**Lihana LW et coll., 2012**). A côté du CRF02\_AG, on retrouve le CRF06\_cpx, représentant parfois plus de 10% des souches isolées dans la région Ouest-africaine, mais également tous les sous-types purs connus, plusieurs recombinants dont essentiellement le CRF09\_cpx, le CRF11\_cpx et plusieurs URF (**Lihana LW et coll., 2012**).

A l'image du reste du continent, la diversité génétique en Afrique de l'Ouest est en perpétuelle évolution avec la circulation de nouveaux variants tels le sous-sous-type A3 qui atteint une prévalence de 20% en Guinée-Bissau, le CRF49\_cpx et de nombreux URFs (**Meloni ST et coll., 2004 ; Delgado E et coll., 2008 ; Imamichi H et coll., 2009 ; Esbjornsson J et coll., 2011**).

En Afrique de l'Est, l'épidémie est dominée par les sous-types C, D et le variant A1 (**Pollakis G et coll., 2003 ; Herbeck JT et coll., 2007 ; Nyombi BM et coll., 2008 ; Kiwanuka N et coll., 2010 ; Serwanga J et coll., 2012**). A Djibouti et en Ethiopie (Corne de l'Afrique), le sous-type C peut atteindre respectivement 73% et 98% des souches isolées (**Kassu A et coll., 2007 ; Mumtaz G et coll., 2011 ; Elmi Abar A et coll., 2012**). Le sous-sous-type A1 est le second variant le plus retrouvé en Afrique de l'Est avec des prévalences de l'ordre de 56% et 70.9% respectivement en Tanzanie et au Kenya (**Kiwelu IE et coll., 2012 ; Nyamache AK et coll., 2013**). Le sous-type D est majoritaire en Ouganda où il co-circule avec le sous-type A et des recombinants A/D (**Ssemwanga D et coll., 2012 ; Nazziwa J et coll., 2013**).

L'épidémie en Afrique australe, se distingue par sa minime diversité génétique malgré des prévalences particulièrement élevées. Elle est dominée par le sous-type C avec des prévalences largement supérieures à 90% (**Bessong PO et coll., 2013 ; Bila DC et coll., 2013**). Cependant, il a été montré une évolution de la diversité génétique dans la région. Le cas le plus spectaculaire est présenté par l'Angola probablement en lien avec sa proximité avec la RDC. Le pays présente une grande diversité génétique incluant les sous types F1, G, A, D, H, K, et un taux de virus recombinants de 42%, parmi lesquels, le CRF02\_AG, le CRF18\_cpx, le CRF25\_cpx et le CRF45\_cpx (**Afonso JM et coll., 2012**).

La grande diversité du VIH a un impact sur tous les aspects de l'infection : tropisme, transmission et progression de la maladie, le diagnostic et monitoring, la réponse au traitement antirétroviral et la recherche vaccinale.

### **III.2 Conséquences de la diversité génétique**

#### **III.2.1 Conséquences biologiques (tropisme cellulaire, transmission et progression de la maladie**

Bien qu'ils partagent certaines propriétés biologiques, le VIH-1 et le VIH-2 présentent *in vivo* des différences importantes. Des études cliniques et virologiques suggèrent que le VIH-2 serait moins virulent que le VIH-1, ce qui se traduit par un taux de transmission plus bas, une phase asymptomatique plus longue, des valeurs de charge virale plus basse se traduisant par une baisse tardive des CD4 et donc un taux de mortalité beaucoup plus faible.

Les raisons qui sous-tendent la pathogénicité réduite du VIH-2 sont encore inconnues et sont certainement le résultat d'une combinaison de plusieurs facteurs (**Popper SJ et coll., 1999 ; Azevedo-Pereira JM et coll., 2005 ; MacNeil A et coll., 2007**). Enfin, les différences biologiques entre sous-types viraux sont beaucoup plus difficiles à mettre en évidence car plusieurs facteurs peuvent influencer la transmission du VIH et l'histoire naturelle de la maladie.

### **III.2.1.1 Tropisme cellulaire**

Les souches de VIH capables d'utiliser les corécepteurs CCR5 des chimiokines (virus R5) sont plus fréquemment transmises que les souches qui utilisent le co-récepteur CXCR4 (virus X4) ; les virus X4 apparaissent tardivement chez les patients infectés et sont associés à une plus rapide progression de la maladie (**Berger EA et coll., 1999**). Ainsi, tous les sous-types du VIH-1 peuvent utiliser les 2 types de corécepteurs, mais le sous-type D serait plus fréquemment « dualtropic » ou R5X4 (**Huang W et coll., 2007 ; Ataher G et coll., 2012**). Le sous-type D, serait par ailleurs associé à une perte de cellules CD4 et progression de la maladie plus rapides (**Baeten JM et coll., 2007 ; Vasan A et coll., 2006**). Même s'il a été mis en évidence des variants du sous type C utilisant l'un ou l'autre des co-récepteurs ou d'autres « dual tropic », le pourcentage de virus X4 semble être plus faible dans le sous-type C que dans le sous-type B, même lorsque les virus sont obtenus chez des patients à un stade de SIDA avancé (**Cilliers T et coll., 2003**).

### **III.2.1.2 Transmission et progression de la maladie**

#### **Transmission du virus**

Les types, sous-types/CRF pourraient également affecter l'efficacité de la transmission du VIH. Il est démontré que le VIH-2 présente une charge virale plus basse se traduisant par un pouvoir infectieux beaucoup plus faible ; un déclin du taux de CD4 plus ralenti associé à une phase asymptomatique plus longue et donc un plus faible taux de mortalité que le VIH-1 (**Marlink et coll., 1994**). Les premières données sur la transmission mère-enfant indiquaient que indépendamment de la charge virale en ARN plasmatique, le sous-type C était plus fréquemment transmis que le sous-type B. Cette différence serait probablement en lien avec des propriétés intrinsèques au sous type (**Renjifo B et coll., 2004**). De même, des études au Kenya ont montré que le sous-type C était associé à une excrétion du virus au niveau vaginal plus élevée que pour les sous-types A ou D. Même si aucune différence significative de transmission n'a été mise en évidence entre ces 2 sous-types et le sous type C, ce résultat implique une possibilité de transmission sexuelle plus probable avec le sous-type C (**John-Stewart GC et coll., 2005**).

Par ailleurs il a été rapporté une forte proportion de virémies prolongées chez des patients après une infection aiguë due au VIH-1 sous type C (**Novitsky V et coll., 2011**). Toutefois, ces virémies à elles seules n'expliqueraient pas la propagation rapide et importante du sous type C en Afrique australe (**Campbell MS et coll., 2013**). En effet, il a été décrit une possible transmission du virus d'un patient contrôleur vers sa partenaire ayant évolué vers le SIDA (**Killian MS et coll., 2012**). Ainsi, les facteurs épidémiologiques, virologiques ou facteurs de l'hôte pouvant affecter la diffusion ou l'émergence d'un sous-type viral ne sont pas bien connus (**Rainwater S et coll., 2005**).

### **La progression de la maladie**

L'impact de la diversité génétique sur la progression de la maladie fait l'objet de nombreuses controverses à travers des études prospectives. Une étude menée au Sénégal sur un nombre limité de professionnelles du sexe avait montré que les femmes infectées par un sous-type non A (C, D et G) avaient une probabilité 8 fois supérieure que celles infectées par le sous-type A pour développer le SIDA. Deux études menées au Kenya et en Ouganda ont montré que les patients infectés par le sous-type D avaient un taux de mortalité plus élevé et un déclin plus rapide du taux de LTCD4+ que ceux infectés par le sous-type A (**Baeten JM et coll., 2007 ; Kiwanuka N et coll., 2008**).

Une étude menée au Royaume-Uni a montré un taux de rebond virologique après 12 mois de traitement hautement actif 4 fois plus important pour le sous type D que pour les sous-types A, B et C (**Easterbrook PJ et coll., 2010**). Des études indépendantes sur des échantillonnages plus importants conduites en Ouganda et au Kenya confirmaient ces résultats ; elles rapportaient une progression plus rapide vers le stade SIDA et des taux de décès plus élevés chez les personnes infectées par le sous-type D que chez celles infectées par le sous-type A (**Kaleebu P et coll., 2002 ; Vasan et coll., 2006**). La disposition du sous-type D à un plus grand degré de dual tropisme pourrait expliquer le fait qu'il soit associé à une plus rapide progression de la maladie en comparaison aux autres sous-types (**Huang W et coll., 2007**).

D'autres études ont rapporté des résultats discordants. C'est le cas d'une étude prospective multicentrique menée au Cameroun et au Sénégal qui n'avait montré aucune différence dans la survie ou la progression clinique de la maladie chez les personnes infectées par le CRF02\_AG en comparaison avec des personnes infectées par d'autres sous-types/CRF (**Laurent C et coll., 2002**). Ces résultats divergents peuvent être liés à des facteurs sociaux et économiques comme, le niveau d'éducation, l'accès aux soins médicaux et la nutrition, les facteurs génétiques de l'hôte, le mode de transmission du virus et les co-morbidités (**Leroy V et coll., 1997 ; Del Amo J et coll., 2002**).

Les interactions entre les facteurs de l'hôte et le VIH-1 peuvent également varier en fonction du sous-type. Il existe des différences de transmission du VIH-1 et de progression de la maladie chez des sujets présentant un HLA de classe I spécifique du sous-type de VIH-1 responsable de l'infection (**Pereyra F et coll., 2010**). La progression vers la phase SIDA est aussi influencée par le type de corécepteur et du tropisme cellulaire. Une étude menée au Brésil a montré que les souches de VIH utilisant le co-récepteur CXCR4 étaient associées à une progression plus rapide vers le stade SIDA (**Sucupira MC et coll., 2012**).

### **III.2.2 Impact sur le diagnostic et le monitoring**

Au plan santé publique, la diversité génétique du VIH et sa dynamique aboutissant parfois à des souches de VIH très divergentes, constitue un défi permanent pour le diagnostic de l'infection (**Plantier JC et coll., 2009**). De ce fait, les techniques commerciales doivent subir un contrôle pour être en mesure de détecter, non seulement tous les variants connus, mais également les nouveaux variants du VIH (**Parry JV et coll., 2003 ; Sickinger E et coll., 2004 ; Lal RB et coll., 2005**). Les tests sérologiques sont basés sur la détection d'anticorps très conservés, dirigés contre des protéines structurales, P24gag et Gp41env des isolats du VIH-1 (**Turner BG et coll., 1999 ; Lal RB et coll., 2005**). Des études antérieures avaient montré un défaut de diagnostic sérologique précis chez des personnes infectées par des souches très divergentes du VIH-1, en l'occurrence le groupe O, en raison des variations au niveau de la Gp41 (**Loussert-Ajaka I et coll., 1994 ; Rayfield MA et coll., 1996 ; Eberle J et coll., 1997**). L'ajout de lysats/peptides du VIH-1 groupe O dans le mélange standard d'antigènes des techniques commerciales a permis de résoudre ce problème.

La plupart des tests immuno-enzymatiques et tests rapides actuels sont sensibles et spécifiques pour le diagnostic des infections chroniques dues aux différents sous-types du VIH-1 groupe M (**Koch WH et coll., 2001 ; Parry JV et coll., 2003 ; Rouet F et coll., 2004 ; Zeh C et coll., 2011**). Malgré ce fait, quelques difficultés dans le diagnostic de personnes récemment infectées avec les sous-types non-B sont encore rencontrées (**Louie B et coll., 2008**). En effet, les ELISA et les tests rapides ont des capacités variables de diagnostic pour les infections récentes avec les sous-types non-B (**Peeters M et coll., 2003**).

La variabilité génétique a un impact minime sur la capacité de détection sérologique du VIH-1 grâce à la conservation des acides aminés des épitopes immunodominants au niveau des protéines structurales. Par contre, le défi est de taille pour les tests de diagnostic moléculaire (**Parry JV et coll., 2003, Butler IF et coll., 2007**). Ceci a poussé à mettre au point des amorces génériques pouvant identifier l'ensemble des sous-types du VIH-1 groupe M, N et O afin de pouvoir confirmer des infections à VIH et à SIVcpz.

Ces mêmes amorces sont également utilisées en épidémiologie moléculaire pour l'analyse phylogénétique des sous-types viraux (**Yang C et coll., 2000**). Enfin, ces amorces sont utilisées pour quantifier la charge virale plasmatique, principalement dans le cadre du suivi de l'efficacité du traitement antirétroviral. Les techniques commerciales de quantification virale ont beaucoup évolué du point de vue de la performance avec l'avènement de l'amplification en temps réel, avec des plateformes de plus en plus automatisées (**Berger A et coll., 2005 ; Choi JY et coll., 2009 ; Karasi JC et coll., 2011**). Néanmoins, de nombreuses études ont montré que certains variants non B et comme le CRF02\_AG prédominant en Afrique de l'Ouest ne sont pas ou sont sous quantifiés par certaines techniques de charge virale (**Swanson P et coll., 2005 ; Wang Y et coll., 2008 ; Gomes P et coll., 2013**).

En ce qui concerne le VIH-2, il n'existe pas encore de kit commercial capable de détecter les différents groupes du virus et la technique NucliSens EasyQ (Biomerieux) est la seule technique qui arrive à quantifier le groupe A du VIH-2 (**Rodés B et coll., 2007**).

La garantie que les tests détectent tous les variants circulants, y compris ceux nouveaux constitue un défi (**Hemelaar J, 2012**), d'où la nécessité de l'évaluation continue et l'assurance de la qualité des tests de quantification virale (**Greig J et coll., 2011**).

### **III.2.3 Impact sur la réponse au traitement antirétroviral**

L'impact de la diversité génétique sur la réponse au traitement est une question cruciale. En effet, les molécules ARV ont été conçues sur la base des souches B, qui ne représentent qu'environ 10% des infections à travers le monde (**Hemelaar J et coll., 2012**).

Il est établi que les souches de VIH-1 groupe O et le VIH-2 sont naturellement résistantes aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (**Descamps D et coll., 1997 ; Shih CK et coll., 1991**). Des études limitées *in vitro* ont suggéré que certains sous-types non-B peuvent-être moins sensibles à certaines catégories de molécules antirétrovirales. On peut citer, le sous-type G qui montre une sensibilité moindre aux inhibiteurs de protéase (**Descamps D et coll., 1998**). Par ailleurs, le polymorphisme observé au niveau de la protéase des souches non-B avait fait supposer une possibilité d'acquisition précoce d'une résistance aux ARV par rapport aux souches B (**Frater AJ et coll., 2002 ; Velazquez-Campoy A et coll., 2002 ; Kosakovsky Pond SL et Smith DM, 2009**).

Dans l'ensemble, il semble que les sous-types de VIH-1 n'entraînent pas de grandes différences dans la réponse au traitement antirétroviral. Le niveau de réponse au traitement antirétroviral chez les patients africains infectés par des souches non-B est généralement comparable aux réponses signalées chez les patients occidentaux des pays du Nord infectés par le sous-type B.

Néanmoins, le polymorphisme spécifique à une souche déterminée peut orienter les voies génétiques d'acquisition de la résistance (**Laurent C et coll., 2002 ; Frater AJ et coll., 2002 ; Santoro MM et Perno FC, 2013**).

### III.2.4 Impact sur la recherche vaccinale

Les défis à la conception d'un vaccin préventif efficace contre le VIH sont énormes. L'un des obstacles majeurs à sa découverte est la grande diversité génétique du virus. Sur 30 ans de recherches, tous les candidats vaccins ayant réussi à stimuler la production de titres élevés d'anticorps neutralisants ont échoué à protéger contre l'infection. Toutes les stratégies vaccinales ont été testées :

- Stratégies utilisant des virus inactivés ou atténués chez les macaques, ayant fourni des résultats sécurisants mais peu satisfaisants et ne permettant pas une expérimentation chez l'homme (**Watkins DI et coll., 2008 ; Mansfield K et coll., 2008**).
- Stratégies d'induction d'anticorps neutralisants par utilisation d'enveloppes recombinantes ou de peptides d'enveloppe du VIH qui ont donné des résultats encourageants chez le chimpanzé, mais sans confirmation sur des modèles macaques (**McCarthy M, 2003 ; Cohen J, 2003**).
- Stratégies basées sur la stimulation des réponses immunitaires cellulaires complémentaires, essentiellement de type CD8. Elles utilisent des vecteurs viraux génétiquement modifiés, recombinés avec des gènes du VIH, non réplicatifs qui induisent des titres de cellules T CD8 très élevés.

L'essai STEP (de phase IIb) utilisant l'adénovirus-5 (Ad5) recombiné avec les gènes *gag*, *pol* et *nef*, fut interrompu du fait d'un taux supérieur d'infection (accompagné d'une non réduction de la charge virale) observé chez les volontaires vaccinés comparés au bras placebo (**Buchbinder S et coll., 2008**).

L'essai de phase III RV144 n'a pas été couronné de succès. Il était basé sur le concept du « prime boost » 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 31,2% (**Rerks-Ngarm S et coll., 2009**).

Du fait des nombreux échecs des stratégies visant à induire une immunité à médiation cellulaire, la recherche sur les anticorps a repris et des études récentes montrent la place importante des Ac neutralisants dans la réponse immunitaire (**Blish CA et coll., 2008 ; Scheid JF et coll., 2009 ; Bomsel M et coll., 2011 ; Haynes BF et coll., 2012**). Pour être efficace, un vaccin contre le VIH devrait pouvoir stimuler à la fois une immunité protectrice à médiation cellulaire et humorale à travers des anticorps ciblant des régions conservées du virus (**Barnett SW et coll., 2010 ; Barouch DH., et coll 2012**). A ce propos, un espoir est permis depuis la découverte de 2 anticorps VRC01 et VRC02 capables de neutraliser in vitro 91% des souches de VIH-1 circulants (**Wu X et coll., 2010**). Cette découverte représente ainsi un réel espoir pour le vaccin car il s'affranchit de la diversité génétique en sélectionnant des sites d'immunisation conservés (de la gp120) communs à toutes les souches virales (**Zhou T et coll., 2010**). Cet espoir pourra être consolidé avec la prise en compte de l'immunité à médiation cellulaire dans les travaux de recherche (**McDermott AB et coll., 2012**).

Parmi les nouvelles cibles possibles des corrélats de protection contre l'infection par le VIH, un espoir est également permis avec la protéine cellulaire HBPB (human phosphate binding protein) qui a des propriétés inhibitrices sur la réPLICATION du VIH. La HBPB était déjà connue, mais ses vertus pour lutter contre le VIH viennent seulement d'être mises en lumière. La protéine agirait sur une voie encore non ciblée par les thérapies actuelles. La protéine serait efficace aussi bien sur les souches sauvages que sur les souches résistantes à l'AZT (**Cherrier T et coll., 2011**).

Enfin, a été décrit un groupe particulier, différents des « patients contrôleurs » appelé « contrôleurs secondaires » capable de contrôler le virus, après l'arrêt de leur traitement ARV mené plusieurs années avec succès. Ce type de contrôle secondaire de l'infection par le VIH pourrait fournir de nouvelles informations sur les corrélats de protection utiles pour les stratégies d'immunothérapie (**Van Gulck E et coll., 2012**).

Pour étudier de la diversité génétique deux techniques sont utilisées : les techniques de biologie moléculaire et les techniques de réaction antigène/anticorps.

### **III.3 Méthodes de détermination des sous types du VIH-1**

Pour la détermination des sous-types viraux du VIH-1, les techniques de choix restent les techniques moléculaires, mais des techniques sérologiques basées sur des réactions immunoenzymatiques peuvent également être utilisées. On distingue pour les techniques moléculaires, l'analyse phylogénétique très largement utilisée et des techniques alternatives : la MHA (Multi Hybridization Assay) et la HMA (Heteroduplex Mobility Assay).

### **III.3.1 Détermination du génotype par les techniques moléculaires**

Pour cette technique, il est nécessaire de disposer d'abord d'une séquence nucléotidique ou protéique de l'échantillon à étudier. Pour cela, l'amplification génique par PCR est effectuée en amont de la réaction de séquençage. Le génotypage par séquençage est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable, mais elle est également la plus coûteuse.

#### **III.3.1.1 Séquençage et phylogénie moléculaire : éléments de base**

##### **III.3.1.1.1 Séquençage nucléotidique**

C'est la méthode de référence pour l'étude de la diversité génétique du VIH. Le plus souvent, elle fait recours à la PCR pour l'amplification du gène (ou des gènes) d'intérêt à étudier à partir de l'ADN proviral ou de l'ADNc obtenu par rétrotranscription de l'ARN viral. Deux grands types de séquençage existent :

###### **III.3.1.1.1.1 Séquençage de première génération**

###### Technique de Frederick Sanger

Il s'agit de la méthode de séquençage la plus utilisée. La méthode de Sanger automatisée est considérée comme étant la technique de séquençage haut-débit de première génération. Elle fait recourt à un séquenceur automatique pourvu d'un laser (ou infrarouge). Son principe repose sur l'utilisation en plus de déoxynucléotides classiques, de nucléotides particuliers marqués par des fluorochromes appelés didéoxynucléotides, dépourvus de groupement OH sur le carbone 3'. Ce sont des terminateurs de chaîne qui, bloquent après leur incorporation la synthèse d'ADN (**Sanger F et coll., 1977**). Durant la polymérisation, il est incorporé de façon aléatoire au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, un déoxynucléotide ou un didéoxynucléotide. Il en résulte un mélange de brins d'ADN de diverses longueurs qui seront ensuite dénaturés et séparés selon leur taille (**Sanger F, 1981**). Sur le séquenceur automatique, les brins de différentes tailles passent successivement devant la source (laser ou infrarouge) qui excite les fluorochromes portés par les didéoxynucléotides et enregistre l'intensité et la couleur du signal correspondant au nucléotide terminant le brin. Ainsi, on obtient des chromatogrammes qui, après édition et traitement informatique, permettent la lecture de la succession des bases de l'ADN séquencé. Après correction et évaluation de leur qualité, les séquences sont prêtes pour une analyse phylogénétique par comparaison à des séquences de référence.

L'impact de virus résistants présents en proportion minoritaire sur la réponse virologique a principalement été retrouvé pour des variants minoritaires porteurs de mutations de résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) de type K103N ou Y181C avec un risque deux à trois fois plus élevé d'échec virologique (**Pilger D et coll., 2011**).

Les techniques de séquençage standard ne détectent que les populations virales présentes à des proportions  $\geq 15\text{-}25\%$  de la population virale globale ; d'où la nécessité de mise en place de nouvelles techniques d'amplification et détection, capables de détecter les variants minoritaires (**Archer J et coll., 2012** ; **Cousins MM et coll., 2012**). Pour cela, des techniques plus sensibles ont été développées (**Pilger D et coll., 2011** ; **Hauser A et coll., 2012**). Ces techniques de séquençage ultrasensibles peuvent être à haut débit ou non et permettent d'atteindre une sensibilité de 0,1 à 1% pour la détection des variants minoritaires.

### **III.3.1.1.1.2 Nouvelles générations de techniques de séquençage ultrasensibles à haut débit ou next-generation sequencing (NGS)**

Les techniques de séquençage de nouvelles générations (NGS) actuelles et celles en développement sont nombreuses (**Zhang J et coll., 2011**). Elles ont en commun l'élimination de l'étape de clonage et la lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. Elles fournissent de ce fait, un grand nombre de données en peu de temps, avec un coût requis pour séquencer un génome nettement plus réduit, en comparaison avec la technique de Sanger (**Beerenwinkel N et coll., 2012**). Les plus largement utilisées d'entre-elles sont, la technique de pyroséquençage, le séquençage par ligation et le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles.

#### **Tehnologie 454 de pyroséquençage (ROCHE)**

Il s'agit d'une méthode introduite en 1988 (**Hyman ED et coll., 1988**). Elle fut améliorée par la suite par introduction de la PCR (**Ronaghi M et coll., 1996** ; **Ronaghi M et coll., 1998**). C'est une technique de séquençage par synthèse (**sequencing by synthesis, SBS**) qui repose sur la détection en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) lors de l'incorporation de nucléotides. L'ADN subit après fragmentation une étape d'amplification par PCR. Cette PCR est réalisée en émulsion, ce qui permet d'effectuer plusieurs millions de réactions indépendantes dans un seul tube. Après préparation du mélange réactionnel avec les enzymes nécessaires et les différents substrats, ce dernier est déposé sur une plaque où chaque emplacement ne peut contenir qu'une seule molécule d'ADN amplifiée.

A la différence de la méthode de Sanger, la réaction de séquençage par synthèse est alors initiée base par base. Si le Nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et libère un pyrophosphate. Une ATPsulfurylase vient alors transformer ce Pyrophosphate (PPi) en ATP. Cet ATP est ensuite utilisé par une Luciférase couplée à une Luciférine pour produire de l’Oxyluciférine et un signal lumineux. Parallèlement une Apyrase intervient pour dégrader les nucléotides en excès. Le signal lumineux récupéré par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) est reproduit sous forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur des pics est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. En cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides. Cette technologie permet d'obtenir aujourd'hui jusqu'à 1 million de séquences pouvant atteindre jusqu'à 400 bases. Les erreurs de séquences détectées sont majoritairement des insertions/délétions dues aux régions homopolymères (répétitions identiques de la même base) (**Brodin J et coll., 2013**).

### **Le séquençage par ligation: SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection; Applied Biosystems)**

Elle est fondée sur l'intégration de plusieurs techniques à savoir, la PCR en émulsion (emPCR), les technologies de plaques en fibre optique picotitrées, le pyroséquençage et les technologies bioinformatiques (**Margulies M et coll., 2005**). L'ADN génomique à séquencer est d'abord fragmenté aléatoirement par nébulisation en petits brins de quelques centaines de bases auxquels on ajoute en présence de ligase deux séquences adaptatrices (A et B) par ligation aux deux extrémités sur lesquels vont s'accrocher les amorces de séquençage. Les fragments sont ensuite mis en contact avec des billes en polystyrène et subit alors une dénaturation. Chaque fragment d'ADN subit une amplification clonale par PCR d'émulsion (ou emPCR) autour des billes dans des microréacteurs (gouttelettes d'une émulsion) avec possibilité de 300 000 réactions de PCR en parallèle. Après amplification les microgouttelettes (microréacteurs) sont dissociées, et les microbilles porteuses de l'ADN simple brin amplifié sont pipetées dans une plaque de pico-titration en fibre optique (PicoTiterplate (PTP) contenant 1,4 millions de puits. Le diamètre des puits est fait de telle sorte à assurer le dépôt d'une seule microbille par puits. Le pyroséquençage est lancé en parallèle dans chacun des puits à partir d'un système microfluidique qui alimente la plaque de picotitration avec les différents réactifs nécessaires et les quatre nucléotides séparément. Avec ce système, 400 000 réactions de séquençage peuvent se faire en parallèle. La plaque est couplée à un capteur CCD qui permet la lecture des images après addition de chaque nucléotide.

Connaissant l'ordre dans lequel les 4 nucléotides sont ajoutés automatiquement, l'analyse des différentes images capturées permet la déduction de la séquence des différents fragments d'ADN (illustré par pyrogramme). Des logiciels bioinformatiques sont ensuite utilisés pour reconstituer la séquence initiale grâce aux groupages des contigs. Les erreurs les plus rencontrées sont des erreurs d'insertion (**Salmela L, 2010**). Le système incorporé de correction d'erreurs associé à l'utilisation de la ligase rend cette technologie très fiable.

### **Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles : technologie CRT Solexa/illumina.**

Il s'agit d'une technique également fondée sur l'intégration de plusieurs technologies. L'ADN à séquencer est fragmenté par nébulisation en fragments d'environ 400 à 500 pb auxquels des séquences adaptatrices sont ajoutés aux extrémités. Les fragments d'ADN simple brin sont ensuite immobilisés sur un support solide (plaqué de verre) avec des amorces s'hybridant aux adaptateurs. Cela permet l'amplification localisée par pontage d'un fragment unique en plusieurs centaines de millions de fragments identiques, appelés «polonie». Le séquençage est alors réalisé directement sur le support où l'ADN a été amplifié. Son principe est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents (CRT : cyclic reversible termination) et par lecture optique de la fluorescence (**Metzker ML, 2010**). Il s'agit d'une terminaison de synthèse basée sur l'utilisation d'un terminator réversible contenant un groupement de protection attaché au nucléotide qui termine la synthèse d'ADN. L'élimination du groupement de protection par photoclyavage utilisant la lumière ultraviolette (> 300nm) implique la restauration du groupement fonctionnel du nucléotide incorporé, ce qui permet à l'ADN polymérase d'incorporer le prochain nucléotide et ainsi de suite.

Le séquençage se fait en temps réel et est basé sur la détection de la fluorescence mais en présence des 4 nucléotides marqués (avantage par rapport à la technologie 454) et sans recours à l'électrophorèse (grand avantage par rapport au séquenceur à capillaire). Des molécules de 25 paires de bases sont séquencées puis alignées, grâce à un logiciel, et comparé à une séquence de référence pour reconstituer la séquence. Une lecture laser permet alors de détecter simultanément toutes les positions incorporées. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre (**Salmela L, 2010**). La très haute densité de la puce à ADN (plus de 100 millions de molécules par centimètres carrés) permet de séquencer environ 100.000 paires de bases par seconde. La méthode, peut produire 100 à 200 millions de matrices pouvant être séquencées sur une même lame (**Metzker ML, 2010**).

### **III.3.1.1.2 Phylogénie moléculaire**

La phylogénie moléculaire permet d'établir par comparaison de séquences (nucléiques ou protéiques) des liens génétiques entre des isolats et comprendre leur histoire évolutive depuis une supposée séquence ancestrale.

Ces liens établis sont traduits par des reconstructions ou arbres phylogénétiques, caractérisés par leur :

- Topologie ou position des nœuds qui représentent une unité évolutive ou état ancestral ou actuel des caractères et
- Longueur qui est la somme de la longueur des branches représentant le nombre de changements évolutifs (exemple le nombre de substitutions nucléotidiques au sein d'une séquence qui sont intervenues depuis la divergence de deux taxons. La branche définit les relations entre les unités évolutives en termes d'ascendance et de descendance.

Ainsi les nœuds représentent les ancêtres communs, et la longueur des branches le temps d'évolution. La distance génétique peut être définie comme étant le nombre de substitutions réalisées au cours de l'évolution entre deux séquences (dissimilitarité), rapporté au nombre de sites des séquences. La base de ces analyses est l'alignement des sites homologues dans les séquences, c'est à dire des sites qui dérivent d'un ancêtre commun. De ce fait disposer d'un bon alignement est de rigueur pour l'obtention de résultats de qualité.

### **III.3.1.1.2.1 Méthodes de reconstruction phylogénétique**

Il existe deux grands types de méthodes permettant la reconstruction d'arbres phylogénétiques :

- méthodes basées sur les calculs de distances entre séquences prises deux à deux, c'est à dire le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre ces deux séquences,
- méthodes basées sur les caractères qui s'intéressent au nombre de mutations (substitutions / insertions / délétions) qui affectent chacun des sites (positions) de la séquence.

#### **Méthodes basées sur le calcul de distances génétiques**

Le principe de ces méthodes est basé sur le calcul du nombre de substitutions réalisées au cours de l'évolution entre deux séquences, rapporté au nombre de sites des séquences pour établir la distance génétique entre deux isolats. Elles estiment la distance évolutive vraie par différents moyens statistiques et mathématiques, telle que la méthode de calcul de Kimura à deux paramètres.

Il s'agit d'une méthode dont l'hypothèse de départ est que les sites de deux séquences évoluent indépendamment, à la même vitesse, et que les substitutions se produisent selon deux fréquences : l'une pour les transitions ( $A \leftrightarrow G$ ,  $C \leftrightarrow T$ ) et l'autre pour les transversions (purine $\leftrightarrow$ pyrimidine), les transitions se produisant deux fois plus que les transversions. La distance génétique est basée sur le calcul de ces fréquences de transitions et de transversions observées entre deux séquences (**Kimura M, 1980**). Plusieurs méthodes basées sur les matrices de distance existent, dont principalement :

- La méthode LS (Least Squares) ou méthode des moindres carrés
- La méthode ME (ou minimum d'évolution), utilisée pour un petit nombre de séquences
- La méthode NJ (Neighbor Joining) ou méthode du plus proche voisin
- La UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic) : pour les séquences peu divergentes.

Cependant, la plus couramment utilisée d'entre-elles est la méthode NJ (Neighbor Joining). Elle consiste à optimiser les branchements à chaque étape de construction par calcul d'une nouvelle matrice dans laquelle figurent les distances modifiées. Ainsi, à chaque distance entre deux espèces, la moyenne des distances de chacune d'entre-elles est retirée à toutes les autres. Les longueurs des branches ainsi que la topologie d'un arbre parcimonieux peuvent être rapidement obtenue en utilisant cette méthode (**Saitou N et Nei M, 1987**).

### Méthodes basées sur les caractères

Ces méthodes utilisent une matrice de caractères (matrice de caractères discrets) : l'état des sites est précisé pour chaque espèce. Il s'agit de méthodes très lentes car le nombre d'arbres possibles (topologies) à examiner est très grand même pour un petit nombre de séquences et pour chacun de ces arbres on doit évaluer le nombre minimum requis de substitutions. Cependant, ces méthodes présentent l'avantage d'être précises. Parmi elles, deux principales méthodes peuvent être citées :

- La méthode du MP (Maximum Parcimony) ou Parcimonie maximum, qui recherche le réseau le plus économique en substitutions permettant le choix du réseau ayant la longueur totale la plus courte. Elle examine tous les sites nucléotidiques, mais n'en conserve pour l'analyse que les sites informatifs (**Sourdis J et coll., 1988**). Ce sont en d'autres termes, des sites qui favorisent le passage d'une séquence à l'autre en utilisant le plus petit nombre de mutations.

- La méthode du ML (Maximum Likelihood) ou maximum de vraisemblance qui prend en compte tous les sites nucléotidiques séparément et calcule pour chaque événement (embranchement, distance entre deux noeuds) la probabilité d'avoir cet événement (vraisemblance). L'arbre construit est celui des embranchements positionnant les différentes séquences les plus probables (**Felsenstein J, 1981**).

La méthode du maximum de vraisemblance est une méthode qui conduit à un résultat très proche de l'arbre évolutif réel. De toutes ces méthodes développées, elle est considérée la plus fiable (**Tateno Y et coll., 1994 ; Guindon S et Gascuel O, 2003**). Au départ, la méthode était celle qui demandait la plus grosse puissance de calcul et celle la plus lente. Elle a beaucoup évolué et est devenue rapide et précise avec la création de la version 3.0 du programme PhyML (**Guindon S et coll., 2010**).

Lorsque le taux d'évolution est très variable d'une branche à l'autre, les trois méthodes (Neighbor Joining, Maximum Likelihood et Maximum-Parcimony) peuvent à des niveaux différents, ne pas récupérer la topologie (arbre) réelle (**Nei M, 1996**). Cependant, avec une ampleur de la divergence de séquences ne dépassant pas 5% et un nombre de nucléotides  $\geq 1000$ , ces méthodes montrent une efficacité bonne et comparable dans l'obtention de l'estimation des longueurs de branche et de la topologie correcte (**Tateno Y et coll., 1994**).

### **III.3.1.1.2.2 Supports statistiques de calcul de la robustesse**

La robustesse mesure la qualité des résultats. La Valeur de bootstrap (**Efron B, 1979**) est devenue la méthode de référence (**Felsenstein J, 1985**) utilisée pour tester la fiabilité des branches internes. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. On applique généralement 100 à 1000 re-échantillonages. Les valeurs de *Bootstrap* représentent le nombre de fois où, parmi les arbres obtenus, on obtient le même embranchement. Plus cette valeur est élevée, plus la solidité de l'embranchement est assurée. Les valeurs idéales de bootstrap varient entre 90% et 95%. Cependant, la valeur limite acceptée est de 70 %. En dessous de cette valeur, la branche n'est plus considérée comme fiable (**Sitnikova T, 1996**).

Pour la méthode du maximum de vraisemblance, la fiabilité des branches est définie par une valeur de *Bootstrap* > 95% et pour que la méthode soit statistiquement valable, il faut 1000 réplications de *Bootstrap*.

### III.3.1.1.2.3 Analyse des recombinants

Elle nécessite des tailles de fragments supérieures à 1000 pb. (**Posada D, 2001**). Elle s'applique à des souches qui ne se lient pas de manière consistante (valeur de *Bootstrap* < 70). Pour déterminer leurs sous types, on procède à des découpages et analyse phylogénique de chaque partie sur la totalité des séquences à étudier. Des programmes spécifiques permettent une analyse automatique à partir des alignements découpés en fragments successifs qui se chevauchent le long des séquences. Les arbres correspondant à ces fragments sont ensuite calculés et les résultats présentés sous forme de graphique avec des courbes correspondant aux valeurs de *Bootstrap*. L'évolution des courbes permet d'estimer les points de recombinaison et déterminer les profils. De nombreuses méthodes et programmes informatiques de détermination des recombinants existent. Les plus utilisées d'entre-eux sont :

Le programme « Diversity plotting », de Rega.<sup>28</sup> Il estime le pourcentage de diversité entre les paires de séquences sélectionnées. Pour cela, le programme considère une fenêtre de 300 à 500 pb sur un alignement après avoir défini un incrément d'environ 20 paires de base (pb). Il établit en fin d'analyse, un graphique de comparaisons des distances génétiques entre la séquence à étudier et les séquences de référence.

Le programme « Simplot/Bootscanning » : Le « Simplot »<sup>29</sup> calcule la similarité (en %) de la séquence à analyser par rapport aux séquences de référence le long de l'alignement. Plus ce pourcentage est élevé, plus la probabilité d'appartenance d'une souche à un groupe de virus de référence est grande. Le "Bootscanning"<sup>30</sup> est basé sur le même principe que le Simplot avec la particularité d'engendrer des arbres le long d'un alignement sur des fenêtres avec un incrément constant. La méthode indique une valeur de "bootstrap" pour chaque arbre produit au cours de l'analyse. Les différences dans la position de la souche à analyser indiquent une possible recombinaison (**Salminen MO et coll., 1995**).

---

<sup>28</sup> <http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html> (Consulté le 02/09/2013).

<sup>29</sup> <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/> (Consulté le 02/09/2013).

<sup>30</sup> <http://www.ktl.fi/hiv/mirrors/pub/programs/> (Consulté le 02/09/2013).

### **III.3.1.2 Techniques génotypiques alternatives**

#### **Single Genom Amplification (SGA)**

La SGA initialement appelé SGS (Single Genom Sequencing) est une technique de détection de variants minoritaires qui par ailleurs est utilisée pour la détection des mutations associées à la résistance aux antirétroviraux (ARV). Le principe de la SGA appliqué au VIH consiste à réaliser une PCR à travers plusieurs séries de dilution pour isoler et amplifier l'ADNc viral issu d'un seul clone viral. Des dilutions en série de l'ADNc produit à partir de l'ARN viral par rétrotranscription permettent la réalisation de plusieurs concentrations. L'ADNc est amplifié par PCR nichée pour chacune des concentrations. La dilution présentant moins de 20% des produits d'amplification est supposée résulter de l'amplification d'un seul clone viral (isolat) d'après la loi de distribution de Poisson. Les produits d'amplification issus de cette dilution sont ensuite séquencés et analysés. L'un des avantages du SGA est de limiter le risque de recombinaison génétique *in vitro* puisque l'ADNc issu d'un seul clone sert de matrice pour chacune des PCR. Le SGA permet l'identification de populations minoritaires résistantes au traitement antirétroviral, de façon plus sensible que le génotypage standard. En effet, elle permet de détecter 10% des mutations de résistance en plus de celles détectées par les techniques de séquençage classique, ce qui lui confère un avantage certain dans le suivi de la variabilité génétique et la détection des mutations associées à la résistance aux ARV (**Palmer et coll., 2005**). La technique peut être utile dans la cartographie des mutations liées à un échappement cellulaire aux réponses immunitaire humorale, notamment dans le cadre du développement vaccinal (**Salazar-Gonzalez et coll., 2008**). Bien qu'elle représente un investissement en termes de temps et de coût, la méthode est devenue la référence pour l'isolement de quasi-espèces virales au sein d'une population spécifique et pour l'analyse de la diversité au sein d'une population virale infectant un individu donné à un instant donné. C'est le cas d'une étude menée en Tanzanie chez les professionnelles du sexe (PS) pour déterminer la distribution des sous-types, infections multiples et fréquence des recombinaisons et une autre menée au Sénégal chez les MSM pour la détermination des variants minoritaires et la confirmation des doubles infections (**Kiwelu et coll., 2013 ; Leye N et coll., 2013**).

### **PCR en temps réel allèle spécifique**

C'est une technique de PCR en temps réel de détermination de variants minoritaires (**Hauser A et coll., 2012**). Extrêmement sensible, elle détecte des mutations ponctuelles par des PCR spécifiques d'allèles. De toutes les techniques de détermination des variants minoritaires, elle est la moins coûteuse. Cependant, elle nécessite une sonde individuelle pour chaque mutation, ce qui constitue une limite dans son utilisation en routine, en lien avec le nombre élevé de mutations associées à une résistance aux ARV.

### **Génotypage par HMA (ou Heteroduplex Mobility Assay)**

Autre méthode alternative d'étude de la diversité génétique des souches de VIH (**Delwart EL et coll., 1993**), elle est basée sur l'analyse électrophorétique des hétéroduplexes. La partie V3-V5 du gène gp120 ou la p24 du gène gag est amplifiée et hybridée avec un produit homologue obtenu à partir d'un plasmide référence de chaque sous-type ou recombinant connu. Après hybridation, les hybrides obtenus sont analysés par électrophorèse. Si la souche est différente de la référence, il se forme une boucle au point de divergence génétique et ce défaut d'appariement se traduit par des anomalies de mobilité, contrairement à une souche semblable à la référence. L'analyse de cette mobilité permet de décider de quel groupe le virus étudié est le plus proche. Cependant, la technique présente quelques inconvénients car elle nécessite une mise à jour permanente des plasmides. Par ailleurs, elle ne permet pas de différencier certaines souches comme les sous types A et G et CRF02\_AG (**Buonaguro L et coll., 2004 ; Heslop OD et coll., 2009**). Cette technique est actuellement délaissée.

### **Génotypage par MHA (Multi-region Hybridization Assay)**

Le MHA a pour but de caractériser les sous-types ou recombinants et de détecter de potentielles doubles infections après amplification de plusieurs régions génomiques (*gag*, *pol*, *env*, *vpu*, *nef*, *tat*) du VIH-1 (**Hoelscher M et coll., 2002 ; Guimarães ML et coll., 2012**). Il s'agit d'une technique d'hybridation basée sur la reconnaissance sonde-séquence cible spécifique utilisant la PCR en temps réel. Elle est utilisée avec succès dans les zones du monde où circule un nombre limité de sous-types comme l'Afrique de l'Est (A, C et D), l'Asie (B, C et CRF01\_AE) ou l'Amérique latine (B, F et CRF12\_BF) (**Herbinger KH et coll., 2006 ; Kijak GH et coll., 2007 ; Hierholzer J et coll., 2002**).

La HMA représenterait un plus gros challenge pour l'Afrique de l'Ouest et du Centre du fait de la circulation d'une multitude de sous-types/CRF. Malgré cela, il a été développé avec succès un nouveau test MHA basé sur 3 régions (gag p17, vpu et nef) du génome viral permettant l'identification de huit variants communs du VIH-1 circulant dans ces deux zones (**Vidal N et coll., 2013**).

### **III.3.2 Détermination des sous types par sérotypage**

Elle se fait par une technique ELISA qui est d'une grande efficacité pour discriminer les deux types de virus, VIH-1 et VIH-2. Par ailleurs, la technique est utile pour le diagnostic des infections à groupes N et O (**Depatureaux A et coll., 2010 ; Vallari A et coll., 2010**).

Néanmoins, la technique reste moins sensible pour différencier les différents sous-types du groupe M (**Plantier JC et coll., 1999 ; Casseb J et coll., 2002**). Cette technique est actuellement délaissée.

La grande diversité génétique du VIH associée à l'infidélité de la transcriptase inverse et au phénomène de recombinaison génétique nécessite le besoin permanent de développer de nouvelles molécules et nouvelles cibles thérapeutiques antirétrovirales. Par ailleurs, pour obtenir une bonne suppression de la réPLICATION virale et une restauration de l'immunité, une association d'au moins 3 molécules antirétrovirales est requise.

## **Chapitre IV : Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux**

La première molécule antirétrovirale : AZT ou Zidovudine a été découverte en 1987 (**St Clair MH et coll., 1987**). Depuis, beaucoup de progrès ont été enregistrés point de vue découverte autant en termes de nombre de molécules qu'en termes de cibles thérapeutiques. Cette avancée a eu comme impact de favoriser la survie des patients séropositifs et d'améliorer considérablement leur qualité de vie (**Gulick RM et coll., 2010 ; Jordan MR et coll., 2011**).

Avec l'avènement des inhibiteurs de la protéase (IP) en 1996 la trithérapie consistant à associer 2 INTI à 1 IP permettant un traitement antirétroviral hautement actif (ou HAART pour Highly active antiretroviral therapy) devient le traitement standard. Avec l'apparition en 1998 des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), de nouveaux schémas HAART deviennent possibles (**Vella et coll., 2012**).

Par sa capacité à diminuer la morbidité et mortalité liées à l'infection à VIH/SIDA et à augmenter l'espérance de vie des patients, la trithérapie a révolutionné la thérapeutique antirétrovirale (**Palella FJ et coll., 1998** ; **Hogg R et coll., 2008**). Cependant, vu que les traitements ARV durent toute la vie, leur efficacité est mise en mal, principalement en raison des difficultés d'adhésion au traitement, de leur toxicité, mais également de la possibilité d'émergence de virus résistants. En effet la résistance aux antirétroviraux (ARV) est un phénomène inévitable et de plus en plus élevée au cours du temps. (**Tozzi V et coll., 2006**). De ce fait, en plus de l'évaluation de nouvelles stratégies d'utilisation, il y a un besoin permanent de développer de nouvelles molécules et nouvelles cibles thérapeutiques à puissance accrue et propriétés pharmacocinétiques améliorées (**Ghosh R et coll., 2011**).

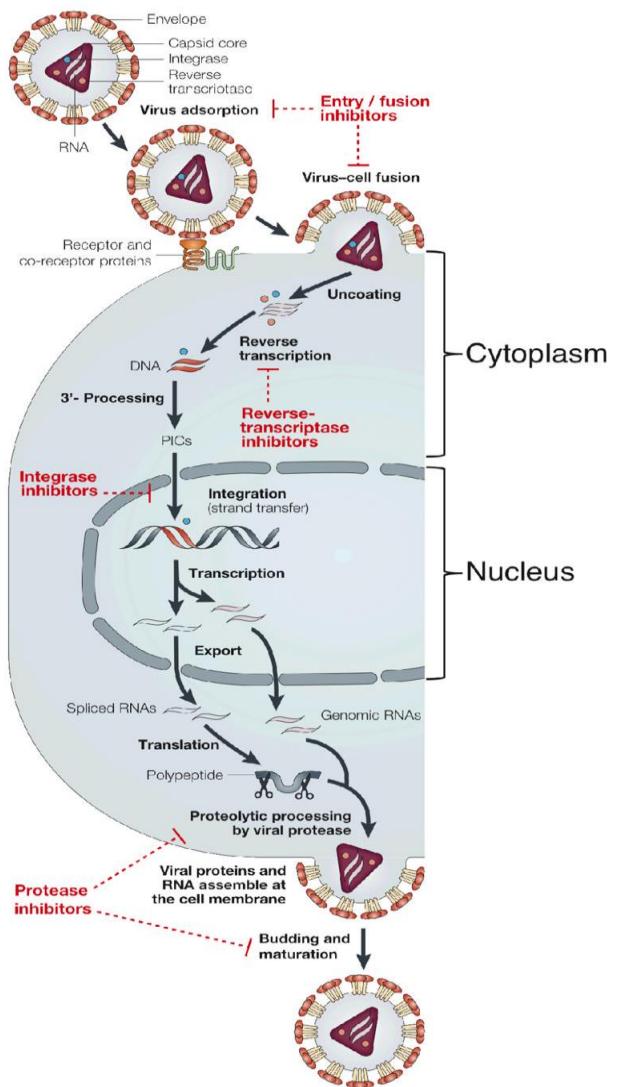
## IV.1 Différentes classes de molécules antirétrovirales

### IV.1.1 Molécules existantes

Le traitement antirétroviral ne permet pas l'éradication du virus, mais permet de réduire à un niveau indétectable sa multiplication afin d'empêcher l'émergence de virus résistants. Pour arriver à cela, la thérapeutique antirétrovirale doit cibler et contrecarrer de manière spécifique, les différentes étapes du cycle de réPLICATION : **i)** l'attachement du virus à la surface de la cellule hôte grâce aux antagonistes des co-récepteurs, **ii)** la fusion des membranes virale et cellulaire via les inhibiteurs de fusion, **iii)** la rétrotranscription de l'ARN en ADNc grâce aux inhibiteurs de la transcriptase inverse, **iv)** l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire à travers les inhibiteurs de l'intégrase et la maturation des particules virales via les inhibiteurs de la protéase (**Tang MW et Shafer RW, 2012**). Actuellement, 25 molécules antirétrovirales réparties en 6 classes sont approuvées par l'US Food en Drug Administration (FDA).<sup>31</sup>

---

<sup>31</sup> <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>  
(Consulté, le 26 Août 2013).



**Figure 23 : Cibles des molécules antirétrovirales (Metifiot M et Coll., 2010).**

Pour assurer une thérapie hautement active contre la réplication virale, une association minimale de 3 molécules est requise. Pour le cas particulier de la chimioprophylaxie de la transmission de la mère à l'enfant (PTME), cette trithérapie qui était en 2010 une option parmi d'autres recommandée par l'OMS, devient désormais l'unique option, selon les nouvelles recommandations 2013 sur l'utilisation des traitements ARV.<sup>32</sup>

Les 2 stratégies thérapeutiques les plus adaptées recommandées par l'OMS en traitement de première ligne, associent en trithérapie 2 INTI et 1 IP ou 2 INTI + 1 INNTI. Dans les pays du Sud, le dernier schéma est le plus largement utilisé (**Hamers RL et coll., 2013**). En absence de contre-indication, l'association en dose fixe (TDF+ 3TC (ou FTC) + EFV) est préférée si elle est disponible.<sup>29</sup>

<sup>32</sup>[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 10/08/2013).

L'association de 3 INTI présente une efficacité virologique inférieure associée à une grande toxicité médicamenteuse et favorise la sélection relativement rapide de mutations de résistance (**Morillo Verdugo R et coll., 2005**). Par contre, une association de 4 INTI intégrant le Ténofovir donne de meilleurs résultats, notamment chez les patients en échec de première ligne (**Stephan C et coll., 2009**).

En 2<sup>ème</sup> ligne, selon les recommandations de l'OMS 2013, les IP plus puissants sont les molécules de choix.<sup>29</sup> Enfin les nouvelles molécules telles que les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs de l'intégrase, les nouvelles générations d'INNTI et d'IP sont réservées aux traitements des patients en échec de seconde ligne (**Gallien S et coll., 2011 ; Eron JJ et coll., 2013**).

#### **IV.1.1.1 Les inhibiteurs d'entrée et de fusion**

L'entrée du VIH-1 se fait suite à la fusion des membranes virale et cellulaire et l'introduction du matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. A Chacune de ces deux étapes correspond une classe d'ARV. Seules deux molécules sont aujourd'hui disponibles : le Maraviroc et l'Enfurvitide (T-20).

##### **IV.1.1.1.1 Antagonistes du co-récepteur CCR5**

Le co-récepteur CCR5 est devenu récemment une nouvelle cible des thérapies antirétrovirales (**Latinovic O et coll., 2009**). Le Maraviroc (Celsentri®), est le premier antagoniste de co-récepteurs ayant obtenu son autorisation de mise sur le marché. Il présente des propriétés pharmacologiques avantageuses, avec une bonne biodisponibilité par voie orale et une meilleure capacité de diffusion dans les compartiments profonds (**Dumond JB et coll., 2009**).

L'utilisation du Maraviroc qui n'est actif que sur les virus à tropisme R5, utilisant le CCR5 comme corécepteur est très limitée (**Gulick et coll., 2008**). Il s'oppose à l'attachement du virus à la surface de la cellule en empêchant la liaison entre la gp120 et le CCR5 par modifications de conformation au niveau de la gp41 (**Kuritzkes DR, 2011**). La molécule est indiquée chez les patients ayant reçu un traitement antirétroviral antérieur et infectés par des virus de tropisme R5. Son efficacité en association à d'autres antirétroviraux a été démontrée par des essais cliniques (étude MOTIVATE-1 et -2), chez des patients en multi-échecs (**Gulick RM et coll., 2008**). Des antagonistes du CXCR4 (AMD-3100 et KRH3955) ont été étudiés et constituent des agents prometteurs dans l'arsenal thérapeutique anti-VIH-1 (**Hendrix CW et coll., 2000 ; Murakami T et Coll., 2009**).

#### **IV.1.1.2 Inhibiteurs de fusion**

L'Enfurvitide ou T-20 est le premier inhibiteur de l'entrée du virus dans la cellule commercialisé. Par liaison au complexe trimérique HR-1, il empêche l'association de HR-1 avec HR-2 qui inhibe le phénomène de fusion-lyse et bloque ainsi l'entrée du virus (**Moyle G et Coll., 2003**). Associé à un traitement de base optimisé, la T-20 assure une suppression virale significative accompagnée d'une bonne restauration immunitaire sur une période de 24 semaines (**Bonora S et coll., 2012**). Même si la molécule est bien tolérée, son coût et surtout son mode d'administration (injection sous-cutanée) occasionnant des réactions douloureuses au site d'injection, limite son usage à long terme. La T-20 a une efficacité prouvée dans de nombreux essais cliniques où son association à un traitement optimisé améliore considérablement les taux de réponse aux nouvelles molécules telles que le Tipranavir, le Darunavir et le Maraviroc (**Fätkenheuer G et coll., 2008, Clotet B et coll., 2007**). Malgré ceci, la molécule n'échappe pas au phénomène de résistance en lien avec des substitutions dans la région HR1 de la gp41 (**Kuritzkes, 2011**).

Des inhibiteurs de fusion de nouvelle génération obtenus par substitution, actifs sur les souches de VIH-1 résistantes au T-20 sont en cours de développement (**Pan C et coll., 2009 ; Naito T et coll., 2009**).

#### **IV.1.2 Les inhibiteurs de l'Intégrase**

Depuis que l'intégrase a été reconnue comme une cible thérapeutique pour le traitement de l'infection à VIH, de remarquables progrès ont été enregistrés dans le développement des médicaments antirétroviraux. Les molécules de cette classe agissent en entraînant une diminution de l'intégration du VIH dans les chromosomes de l'hôte (**Witvrouw M et coll., 2004 ; McColl DJ et coll., 2010**).

Le Raltegravir est le premier inhibiteur d'intégrase approuvé par le FDA. D'abord utilisé pour les patients en échec thérapeutique (en 2007), il va par la suite servir de traitements de 1ère ligne (FDA notifications, 2009).<sup>33</sup> Il est en effet plus toléré et peut constituer une alternative à l'Efavirenz dans le cadre d'un traitement de première ligne en association avec le Ténofovir et l'Emtricitabine (**Lennox JL et coll., 2009**). La molécule est indiquée pour le traitement des adultes en échec virologique, présentant une résistance multiple aux ARV (**Stellbrink HJ et coll., 2009**).

Le Raltegravir est également efficace contre le VIH-2 (**Gottlieb GS et coll., 2011**). Il agit en inhibant de façon compétitive la réaction de transfert de brin de l'ADN proviral par liaison avec les ions métalliques dans le site actif de l'intégrase (**Witvrouw M et coll., 2004**).

<sup>33</sup> [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/022145s013lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/022145s013lbl.pdf) (Consulté le 16/02/2013).

Le Dolutegravir (DTG) est efficace contre les souches de VIH résistantes aux inhibiteurs de l'intégrase de 1ère génération avec des effets secondaires similaires au placebo (**Vandeckerckhove L, 2010**). D'autres inhibiteurs de l'intégrase sont en développement (**Ghosh RK et coll., 2011**).

#### IV.1.1.3 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Ils sont regroupés dans 2 grandes familles de molécules antirétrovirales qui ont une action inhibitrice sur la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN complémentaire.

##### IV.1.1.3.1 Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la Reverse Transcriptase

Première famille de molécules antirétrovirales développées, les INTI sont des analogues des nucléosides naturels dont ils diffèrent généralement par l'absence d'hydroxyle en 3'. Ce sont des inhibiteurs compétitifs qui doivent subir une triple phosphorylation dans la cellule infectée pour être actifs (**Sarafianos SG et coll., 2009**). Ils agissent au niveau du site de polymérisation de l'enzyme et bloquent l'elongation de l'ADN. Leur intégration dans l'ADN en cours de formation empêche l'incorporation de nouvelles bases. L'elongation de la chaîne d'ADN proviral ainsi bloquée empêche toute réPLICATION. Les INTI sont actifs sur les 2 types de virus VIH-1 et VIH-2. Plusieurs analogues nucléosidiques/nucléotidiques ont été approuvés par la FDA (AZT, 3TC, ddI, d4T, FTC, TDF et ABC). Cependant, l'OMS recommande depuis 2010 après évaluation des coûts, le remplacement progressif dans les lignes de traitements de la D4T (vue sa toxicité) par l'AZT ou le TDF, même chez les patients pour qui l'échec virologique n'a pas été documenté.<sup>34</sup>

En lien avec sa toxicité limitée il a été démontré que le TDF présente plus de bénéfice que l'AZT et serait dans un contexte de non disponibilité de la charge virale plus préférable (**Tang MW et coll., 2013**).

Le TDF est un nucléotide monophosphate appartenant à la classe des inhibiteurs nucléotidiques de la RT qui nécessite une double phosphorylation au lieu de 3 pour être actif (**Tsibris AM et Hirsch MS, 2010**). Présentant une demi-vie intra-cellulaire beaucoup plus longue que les INTI, il est le seul représentant actuel de sa classe.

L'association TDF/FTC (Truvada) administrée par voie orale, ayant montré une baisse de 75% de l'incidence du VIH, est le premier traitement préventif contre le VIH destinée aux personnes à risque hétérosexuel approuvé par le FDA (**Baeten JM et coll., 2012**).

<sup>34</sup> [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764_eng.pdf) (Consulté, le 14/02/2013).

Beaucoup d'espoir sont permis pour l'administration (vaginale ou rectale) du TDF, en application locale dans le cadre d'une prophylaxie pré-exposition sous forme de gel (**Rohan LC et coll., 2010** ; **Baleta A, 2010** ; **Sokal DC et coll., 2013**). Son administration par voie orale a également montré des résultats encourageants (**Peterson L et coll., 2007** ; **Guest G coll., 2010**) mais parfois avec une différence d'efficacité non significative comparée au Truvada (**Baeten JM et coll., 2012**).

#### **IV.1.1.3.2 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse**

Découverts en 1998, les INNTI sont des inhibiteurs non compétitifs de la TI. Sans subir de transformation, ils agissent directement au niveau d'une poche hydrophobe, distincte mais proche du site actif de l'enzyme au niveau de la sous-unité p66. L'inhibition de l'enzyme se fait par une distorsion du site polymérasique actif (**De Clercq E, 1998**). La poche hydrophobe de la p66 où se lient les INNRT est moins conservée que le site de liaison des dNTPs, ce qui confère au virus une prédisposition à développer rapidement des résistances vis à vis des molécules de cette classe. Les INNTI sont des composés hautement actifs sur le VIH-1, mais ils restent inefficaces sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O du fait d'une résistance naturelle (**Balzarini J, 2004**).

La quasi-totalité des INNTI de première génération (Névirapine, Efavirenz, Délavirdine) ont le même mécanisme d'action, ce qui fait qu'une seule mutation au niveau du site de liaison de la molécule suffit pour entraîner une résistance croisée au sein de la classe (**Tsibris et Hirsch, 2010**).

L'Etravirine ayant vu le jour en 2008 tout comme la Rilpivirine, récemment commercialisée et dont l'efficacité a été prouvée sont des INNTI de seconde génération à barrière génétique plus élevée que les INNTI de première génération (**Sax PE, 2008** ; **Cohen CJ et coll., 2012**).

L'Etravirine est efficace lorsqu'elle est utilisée en trithérapie de 2ème ligne, chez des patients présentant une résistance multiple aux ARV (**Sax PE, 2008** ; **Schiller DS et coll., 2009**).

La Rilpivirine présentant une puissante activité antirétrovirale est caractérisée par une longue demi-vie. Mieux tolérée que les INNTI de 1ère génération, elle présente une efficacité similaire à celle de l'Efavirenz, l'INNTI actuellement la plus largement utilisé. Elle présente cependant une résistance croisée avec l'Etravirine (**Azijn H et coll., 2010**).

La disponibilité de la Rilpivirine en association avec le Ténofovir et l'Emtricitabine en combinaison à dose fixe, rend son utilisation encore plus attrayante. Néanmoins son efficacité chez les patients ayant une charge virale de base élevée (supérieure à 5 log) doit faire l'objet d'évaluation (**Fernández-Montero JV et coll., 2012** ; **Lyseng-Williamson KA et coll., 2012**).

#### **IV.1.1.4 Les Inhibiteurs de la protéase**

Suite à la découverte qu'une mutation au niveau du gène *pol* de la région de la protéase empêchait la maturation du précurseur de la polyprotéine Gag, l'enzyme protéase fut considérée comme une cible potentielle pour un traitement antirétroviral (**Oxford JS et coll., 1989 ; Park J et coll., 1993**). Les IP ont la propriété d'aller occuper le site actif de la protéase avec une haute affinité et bloquer ainsi l'activité de l'enzyme même à des concentrations très basses.<sup>35</sup>

Depuis 1998, dix IP dont le Ritonavir (présentant une action inhibitrice sur le cytochrome P450) ont été mis sur le marché. Par ailleurs, les IP sont métabolisés par le cytochrome P450. De ce fait, ils sont généralement administrés en association avec le Ritonavir à faible dose, ce qui permet une augmentation de la demi-vie du produit auquel il est associé, baissant ainsi le nombre de prises et la toxicité médicamenteuse, d'où le terme d'IP boosté (**von Moltke LL et coll., 1998 ; Licherfeld M et coll., 2003**). Les IP sont actifs sur les deux types de VIH (1 et 2). Suivant leur degré de tolérance et leur barrière génétique, plusieurs générations d'IP existent. Les IP de 1ère génération (Indinavir, Saquinavir, Nelfinavir, Ritonavir) présentent une barrière génétique assez basse favorisant l'émergence rapide de résistance croisée et sont associés à des effets secondaires assez sérieux.

Pour répondre au souci de limiter les effets secondaires et de minimiser le risque d'émergence de mutants résistants associés aux IP de première génération, de nouvelles générations de molécules généralement utilisées en cas d'échec thérapeutique de 1ère ligne (Lopinavir/Ritonavir) voire chez des patients présentant une résistance multiple (Darunavir, Tipranavir) ont été développées (**Vergani B et Rusconi F 2011**).

Le GS-9350 (Cobicistat) est une molécule capable d'améliorer l'efficacité d'autres molécules antirétrovirales co-administrées (rôle de booster), pouvant constituer une alternative possible pour le Ritonavir (**Mathias AA et coll., 2010**).

Plusieurs combinaisons intégrant des inhibiteurs de la TI dont l'objectif est de réduire le nombre de prises avec la meilleure tolérance, ont été développées et approuvées par la FDA, alors que d'autres sont en cours de développement. Pour les combinaisons déjà approuvées, on peut citer l'Atripla associant (Efavirenz, Ténofovir et Emtricitabine), la pilule 4-en-1 nommée QUAD associant (Elvitégravir, Ténofovir et Emtricitabine et le Cobicistat (GS9350) et Complera<sup>TM</sup>/Evipler<sup>TM</sup> associant (Rilpivirine, l'Emtricitabine et le Tenofovir) (**Permpalung N et coll., 2012**).

---

<sup>35</sup> [http://www.pistes.fr/transcriptases/47\\_415.htm](http://www.pistes.fr/transcriptases/47_415.htm) (Consulté le 20/02/2013).

Comparées entre elles, les deux combinaisons (QUAD et Compléra) présentent une efficacité comparable et meilleure que celle de l'Atripla, (**Lyseng-Williamson KA et Scott LJ, 2012 ; Bernardini C et Maggiolo F, 2013**).

**Tableau II : Liste des ARV approuvés par la FDA et commercialisés en 2013.<sup>36</sup>**

Non générique (DCI)	Abréviation	Nom commercial
<b>Inhibiteurs nucléosidiques/Nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)</b>		
Zidovudine	AZT	Rétrovir®
Didanosine	DDI	Videx®
Stavidune	D4T	Zérit®
Lamivudine	3TC	Epivir®
Emtricitabine	FTC	Emtriva®
Abacavir	ABC	Abacavir®
Tenofovir disoproxil*	TDF	Viread®
<b>Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)</b>		
Névirapine	NVP	Viramune®
Efavirenz	EFV	Efavirenz®
Delavirdine	DLV	Rescriptor®
Etravirine	ETV	Intelence®
Rilpivirine	RLV	Edurant®
<b>Combinaisons associant des INTI</b>		
Zidovudine + Lamivudine	AZT + 3TC	Combivir®
Abacavir + Lamivudine	ABC + 3TC	Epzicom®
Tenofovir + Emtricitabine	TDF + FTC	Truvada®
<b>Inhibiteurs de la protéase</b>		
Saquinavir	SQV	Invirase®
Ritonavir	RTV	Norvir®
Indinavir	IDV	Crixivan®
Nelfinavir	NFV	Viracept®
Fosamprenavir	Fos-APV	Telzir®
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra®
Atazanavir	ATZ	Reyataz®
Tipranavir	TPV	Aptivus®
Darunavir	DRV	Prézista®
<b>Inhibiteur du corécepteur CCR5</b>		
Maraviroc	MRV	Celzentry®
<b>Inhibiteurs de fusion</b>		
Enfurvitide	T20	Fuzéon®
<b>Inhibiteurs de l'intégrase</b>		
Raltegravir	RVG	Isentress®
Dolutégravir	DTG	Tivicay®
<b>Combinaisons en prise unique</b>		
Zidovudine + Lamivudine + Abacavir	AZT + 3TC +ABC	Trizivir®
Tenofovir+Emtricitabine+Efavirenz	TDF+FTC+EFV	Atripla®
Emtricitabine+Rilpivirine+Tenofovir	FTC+RLV+TDF	Complera®
Elvitegravir+Cobicistat+Emtricitabine+Tenofovir	EVG+GS9350+FTC+TDF	Stribild®

<sup>36</sup> <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>  
(Consulté, le 26/08/2013).

## **IV.1.2 Molécules antirétrovirales en développement**

Avec l'apparition permanente de souches de VIH résistantes aux molécules antirétrovirales disponibles, disposer de molécules ARV actives devient un souci constant. Il y'a donc nécessité de poursuivre la recherche pour disposer de nouvelles molécules mieux tolérées avec une barrière génétique plus élevée aussi bien pour les classes d'ARV déjà connus que dans le cadre de nouvelles cibles thérapeutiques (**Ghosh RK et coll., 2011**).

### **IV.1.2.1 Classes existantes (en développement)**

**Concernant les INTI**, 4 molécules de 2ème génération (Amdoxovir, Elvucitabine, Racivir, Apricitabine) sont en cours de développement, mais exception faite de l'Apricitabine, les essais de phase II n'ont pas montré une grande promesse thérapeutique (**Ghosh R et coll., 2011**).

#### **Pour les INNTI,**

Les INNTI sont caractérisés par une faible barrière génétique, une toxicité élevée associée à des réactions d'hypersensibilité. La recherche de nouvelles générations de molécules d'INNTI est basée sur leur capacité à rester actifs devant certaines mutations spécifiques de résistance aux INNTI déjà connues. C'est sur cette base que l'Etravirine, molécule déjà approuvée a été synthétisée ainsi que la Dapavirine, molécule en cours d'investigation notamment en application vaginale (**Zhan Pet coll., 2009 ; Cranston RD et coll., 2013**)

D'autres molécules comme le GSK 2248761, RDEA806 et BILR 355 BS font l'objet d'essais de phase II (**Usach I et coll., 2013**)

**Pour les inhibiteurs de l'intégrase**, un analogue du Raltégravir, l'Elvitegravir (EVG) est en phase III de développement (**Ghosh RK et coll., 2011 ; Quashie PK et coll., 2012**). L'Elvitégravir a présenté une bonne activité antivirale au cours des essais de phase IIb mais présente *in vitro* le même profil de résistance que le Raltégravir. Il a été par ailleurs montré que la combinaison en dose fixe à base de d'Elvitegravir potentialisé par le Cobicistat en association avec l'Emtricitabine et le Ténofovir, constituerait une nouvelle stratégie de traitement attrayante chez les patients naïfs (**Sax PE et coll., 2012**).

**Dans la classe des inhibiteurs de fusion**, le Sifuvirtide présente une activité antirétrovirale, une tolérance, une demi-vie et un profil de résistance améliorés comparé à l'Enfurvitide permettant une réduction des doses et du nombre de prises. Le Sifuvirtide est hautement efficace contre des souches résistantes à l'Enfurvitide (T20) (**Henrich TJ et Kuritzkes DR, 2013**).

Avec des mécanismes d'action différents, la combinaison Sifuvirtide avec la T20 peut améliorer l'efficacité et le profil de résistance, ce qui pourrait amener à une réduction de la posologie et du nombre de prises (**He Y et coll., 2008 ; Pan C et coll., 2009**). A ce jour, il n'a pas encore été mis en évidence de rapports de résistance croisée entre l'Enfurvitide et le Sifuvirtide (**Ghosh et coll., 2011**). Avec des résultats extrêmement prometteurs, l'essai de phase IIb du Sifuvirtide vient de s'achever.<sup>37</sup>

Une étude menée en Chine évaluant le potentiel du Sifuvirtide formulé en gel microbicide préventif a montré une efficacité contre les VIH-1 sous-types B, C, CRF07\_BC et CRF01\_AE et une stabilité du gel d'au moins 8 semaines, même à 40°C *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats suggèrent que le Sifuvirtide pourrait faire l'objet d'un essai pré-clinique ou clinique en tant que microbicide vagino-rectal pour la prévention de la transmission sexuelle du VIH. En outre le Sifuvirtide est susceptible d'exercer son effet synergique avec d'autres classes d'antirétroviraux, tels que les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase, et ainsi être utilisé dans le développement d'un candidat microbicide plus puissant (**Li L et coll., 2012**).

**Dans la classe des antagonistes des co-récepteurs du CCR5**, le Vicriviroc présentait une bonne alternative au Maraviroc. Cependant, suite à des essais de phase III (VICTOR-E3 et VICTOR-E4) n'ayant montré aucun avantage réel en termes d'efficacité et de réduction des effets secondaires, le développement de ce produit a été arrêté (**Caseiro MM et coll., 2012**). D'autres antagonistes du CCR5 ont été étudiés notamment, le Cenicriviroc en phase 2b d'essais après des résultats d'essais précoces encourageants, l'Aplaviroc qui, après des essais de phases IIb assez prometteurs, est en phase 3 de développement (**Kuritzkes DR, 2009 ; Henrich TJ et Kuritzkes DR, 2013**).

#### **IV.1.2.2 Nouveaux concepts thérapeutiques**

##### **IV.1.2.2.1 Les inhibiteurs d'entrée**

Afin d'empêcher l'entrée du virus dans les cellules CD4+, l'inhibiteur peut cibler soit des éléments cellulaires comme les anticorps monoclonaux dirigés contre les co-récepteurs ou la molécule CD4, soit le récepteur viral représenté par la gp120 pour s'opposer à sa liaison avec la molécule CD4. Le développement des antagonistes du co-récepteur CXCR4 n'a pas encore connu de succès à ce jour (**Alexander L et coll., 2009 ; Moyle G et coll., 2009 ; Henrich TJ et coll., 2013**).

A l'opposé, pour les antagonistes du CCR5, de nouvelles molécules comme le PRO 140 sont en cours de développement. Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre le co-récepteur CCR5.

---

<sup>37</sup>[http://www.chinadaily.com.cn/regional/2010-08/09/content\\_11124662.htm](http://www.chinadaily.com.cn/regional/2010-08/09/content_11124662.htm). (Consulté, le 26/02/2013).

L'injection sous-cutanée du PRO 140 à travers une étude de phase II randomisée en double aveugle, contrôlée par placebo, a démontré une bonne tolérance et une activité antirétrovirale puissante et prolongée chez des adultes infectés par des VIH-1 de tropisme R5. Cet essai démontre la preuve du concept d'un anticorps monoclonal administré par voie sous-cutanée (**Jacobson JM et coll., 2010**). Le PRO 140, capable d'une inhibition totale des isolats R5, n'a aucun effet sur les isolats de tropisme X4 (**Cilliers et coll., 2003**).

Les anticorps monoclonaux anti-CD4 bloquent l'interaction entre la gp120 et le CD4 et inhibent le processus d'entrée virale par liaison avec la molécule CD4. Une molécule est à l'étude; Ibalizumab, initialement appelé TNX 355 (**Jeffrey M et coll., 2009**).

L'Ibalizumab fait actuellement l'objet d'un essai clinique de Phase II (**Ghosh et coll., 2011**). Cette molécule n'empêche pas la liaison du gp120 au CD4, mais diminuerait la flexibilité du récepteur CD4, ce qui entrave l'accès de la gp120-CD4 liée au CCR5 et CXCR4 (**Zhang XQ et coll., 2006**). Ces anticorps anti-CD4 n'ont montré aucun effet indésirable grave à court terme, ni de déplétion du taux de CD4 (**Jeffrey M et coll., 2009**).

Concernant le blocage de la liaison gp120/CD4, la PRO 542 (CD4-IgG2) est une protéine de fusion tétravalente conçue pour empêcher l'attachement du virus par sa glycoprotéine 120 à la molécule CD4. Elle neutralise largement les isolats primaires du VIH-1 en se liant à la glycoprotéine gp 120. Elle a démontré une activité antirétrovirale, sans toxicité significative lors des essais à des doses uniques allant jusqu'à 25 mg/kg, associée à une réduction significative du taux d'ARN plasmatique en particulier chez les patients à un stade avancé (**Fletcher CV et coll., 2007**).

#### **IV.1.2.2.2 Les inhibiteurs de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire**

Le LEDGF/p75 (pour Lens epithélium-derived growth factor), est une protéine cellulaire (**Cherepanov P et coll., 2003**) qui a été identifiée comme étant un cofacteur essentiel de l'intégration du VIH-1. En interagissant directement avec l'intégrase, LEDGF/p75 permet le ciblage et l'intégration du génome viral dans des régions spécifiques du génome humain (**Cribier A et coll., 2007 ; Schrijvers R et coll., 2012**). La réPLICATION virale efficace est très fortement tributaire de ce cofacteur. En effet, il a été démontré que des souches VIH de laboratoire étaient capables de se répliquer en l'absence de LEDGF/p75 mais présentaient un défaut de réPLICATION drastique (**Schrijvers R et coll., 2012**). Le mécanisme des inhibiteurs du LEDGF/p75 diffère de celui des inhibiteurs de l'intégrase.

Deux membres prometteurs de ce groupe sont : le CX04328, puissant inhibiteur de l'interaction LEDGF/p75-intégrase et de la réPLICATION virale qui n'a montré aucune toxicité sur des cultures cellulaires ni de résistance croisée avec les inhibiteurs d'intégrase comme le Raltegravir et l'Elvitégravir ; le CX06387, le plus puissant à ce jour et très fortement sélectif. Il a produit de bonnes données sur la toxicité préliminaires, ce qui fait de lui un candidat très prometteur pour le développement clinique (**Ghosh RK et coll., 2011**).

#### **IV.1.2.2.3 Les inhibiteurs de maturation**

Le Bevirimat est la première molécule de cette classe. Il perturbe la réPLICATION du VIH en empêchant la maturation virale, par inhibition d'une étape tardive du processus de transformation de Gag. Par opposition aux inhibiteurs de la protéase qui ciblent le site actif de la protéase, il se fixerait sur Pr55Gag, bloquant la conversion du précurseur de capsid du VIH-1 CA-SP1 (p25) en protéine de capsid (p24) mature (**Nguyen AN et coll., 2011**) conduisant ainsi à la formation de virions immatures et peu infectieux. C'est un puissant inhibiteur contre un large éventail d'isolats du VIH-1, parmi lesquels des variants résistants. Cependant, il présente une sensibilité réduite vis-à-vis des souches présentant des mutations de résistance aux IP. En effet pour les isolats de VIH présentant une résistance à un inhibiteur de la protéase, la prévalence des mutations de résistance au Berivimat est porté à 45% (**Verheyen J et coll., 2010**). En raison d'une biodisponibilité faible (**Lalezari J et coll., 2009**) et sa sensibilité diminuée vis-à-vis des souches présentant les mutations de résistance aux IP (**Verheyen J et coll., 2010**), le développement de la molécule a été arrêté (**Ghosh RK et coll., 2011**).

Chacune des molécules de l'arsenal important des drogues antirétrovirales peut être utilisée dans le cadre d'une trithérapie antirétrovirale capable d'amener la réPLICATION virale à un niveau indéetectable. Cependant cette inhibition de la réPLICATION virale dépend essentiellement de l'efficacité du traitement antirétroviral administré, la bonne adhésion du patient et la sensibilité de la souche virale infectante au traitement administré. Toutefois, plusieurs obstacles se dressent contre cette efficacité thérapeutique : effets indésirables, toxicité, pénétration limitée des médicaments dans certains réservoirs viraux, l'observance du traitement, les co-infections, en particulier (hépatites et tuberculose) et l'émergence de souches de VIH résistantes. La survenue de la résistance aux ARV est l'une des causes majeures de l'échec thérapeutique.

## **IV.2 Résistance aux antirétroviraux**

### **IV.2.1 Définition**

La résistance est définie comme une persistance de la réPLICATION virale en présence d'un inhibiteur normalement actif. Elle est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes des enzymes (protéase, transcriptase inverse, intégrase) ou des protéines (protéine d'enveloppe gp41) cibles de la thérapeutique antirétrovirale.

**Trois types de résistance sont décrits :**

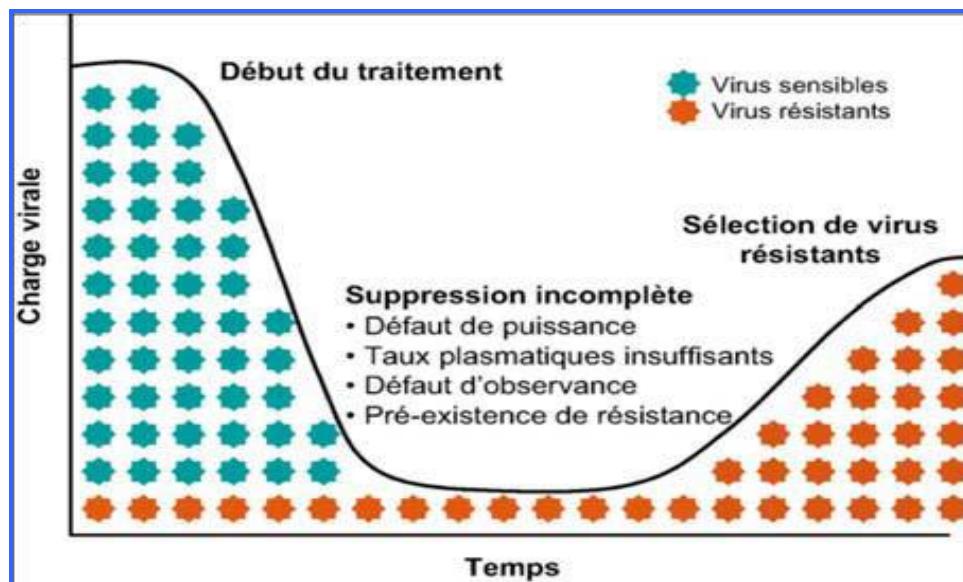
- **la résistance naturelle** qui est le résultat d'un polymorphisme naturel. C'est le cas du VIH-1 groupe O et du VIH-2, naturellement résistants aux INNRT.
- **la résistance acquise ou induite**, également appelée résistance secondaire qui survient chez un patient sous traitement ARV. Elle est le résultat d'une multiplication virale en présence d'une concentration de médicament sub-optimale non suffisante, pour induire une réduction significative de la réPLICATION virale.
- **la résistance primaire ou transmise** qui est observée chez des patients naïfs de tout traitement antirétroviral, infectés par des souches d'embrée résistantes.

La sélection de mutations de résistance est liée essentiellement au taux d'erreurs élevé de la transcriptase inverse non dotée d'une fonction d'édition et à la pression de sélection exercée par un TARV sub-optimal. Ainsi, du fait d'un taux de mutations de l'ordre de 1-10 par cycle de réPLICATION, la transcriptase inverse génère des variants ou essaims au sein de la population virale globale (**Ji J et coll., 1992**).

Le facteur déterminant pour la survenue des mutations de résistance est la vitesse de réPLICATION qui en présence d'un traitement ARV inefficace, va éliminer la population sensible pour favoriser l'émergence de souches résistantes en raison de leur avantage réPLICatif.

Eu égard à cela, la molécule antirétrovirale ne serait pas directement inductrice de résistance mais serait plutôt responsable de la sélection de la souche virale la plus apte à se développer dans le nouvel environnement qu'elle impose, sur la base de la capacité de réPLICATION et de mutation intrinsèque (**Shafer RW et coll., 1999**). La survenue de la résistance dépend donc de facteurs pharmacologiques (taux sub-optimal d'antirétroviral, interactions médicamenteuses), de la puissance du traitement antiviral mais aussi de la « barrière génétique » du virus vis à vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre de mutations requises pour qu'un virus acquiert une résistance. La vitesse d'émergence d'une souche résistante dépend de sa « barrière génétique ». C'est ainsi que la Névirapine (NVP) et la Lamividune (3TC) ne nécessitent qu'une seule mutation pour développer un haut niveau de résistance lors d'un traitement qui les comporte.

Pour certaines molécules telles que L'AZT, mais particulièrement les IP, l'accumulation dans le temps de plusieurs mutations est nécessaire pour l'acquisition de la résistance (**Zhang YM et coll., 1997P ; Preston BD et coll., 1988 ; Shafer RW, 2002**). La figure 27 représente la pression de sélection médicamenteuse sur l'émergence de mutants résistants.



**Figure 24 : Sélection de variants résistants sous la pression d'un traitement ARV non suppressif (Delaugerre C, 2007).**

#### IV.2.2 Mutations associées à la résistance aux antirétroviraux

Les mutations de résistance sont divisées en deux catégories (**Shafer RW, 2002**) :

- **les mutations majeures** à impact considérable sur la sensibilité du virus aux antirétroviraux. Elles surviennent au niveau du site actif de l'enzyme (ou au niveau de la cible) et confèrent une résistance phénotypique mesurable.
- **les mutations mineures** qui augmentent la résistance seulement lorsqu'elles sont associées à d'autres mutations ou compensent l'activité réplicative par la présence des mutations majeures. Elles se situent généralement à distance du site actif et peuvent diminuer le fitness viral.

D'autres types de mutations ont été rapportés sur des gènes ne codant pas les cibles thérapeutiques. C'est le cas de celles survenant au niveau des sites de clivage (p7/p1 et p1/p6) situés sur le gène *gag*. Elles pourraient jouer un rôle dans la résistance, en particulier contre les inhibiteurs de protéase (**Zhang YM et coll., 1997, Larrouy L et coll., 2010**) et compenseraient la capacité de réPLICATION réduite de virus résistants aux médicaments (**Verheyen J et coll., 2006**).

Des mutations isolées dans les sites de clivage de gag ne semblent pas conférer une résistance aux IP, mais elles pourraient se substituer à des mutations mineures (**Banke S et coll., 2009**).

Aucune classe de molécules décrites à ce jour, même celles de découverte récente n'échappe aux mutations de résistance aux ARV (**Shafer RW et Schapiro JM, 2008 ; Jhonson VA et coll., 2011**). Trois algorithmes d'interprétation des mutations de résistance établis par des experts et mis à jour régulièrement existent : le HIV French Resistance algorithm,<sup>38</sup> HIV drug resistance database<sup>39</sup> et Rega Institute Drug Resistance Interpretation Algorithm.<sup>40</sup>

Globalement les algorithmes d'interprétation des mutations aux ARV sont comparables, cependant certaines discordances persistent entre eux (**Ravela J et coll., 2003**). Le nombre de discordances qui semble être significativement associé au sous-type viral (**Snoeck J et coll., 2006**) serait plus important pour les sous-types non-B (**Yebra G et coll., 2012**). Avec sa mise à jour annuelle, la liste de l'IAS-USA Mutations Associated With Drug Resistance (<https://www.iasusa.org/>), représente un consensus d'experts prenant en compte les 3 algorithmes pré-cités (**Johnson VA et coll., 2003 ; Johnson VA et coll., 2009 ; Johnson VA et coll., 2011, Johnson VA et coll., 2013**).

**Tableau III : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'entrée (Johnson VA et coll., 2013).**

MUTATIONS IN THE ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS						
Enfuvirtide <sup>a</sup>	G 36	I 37	V 38	Q 39	Q 40	N 42
	D S	V M	A M	R H	H T	N D
Maraviroc <sup>c</sup>	E					

See User Note

**Tableau IV : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase (Johnson VA et coll., 2013).**

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS							
Dolutegravir <sup>aa</sup>			E 138	G 140		O 148	
			A K	S A		H	
Elvitegravir <sup>bb</sup>	T 66	E 92	T 97		S 147	Q 148	N 155
	I A K	Q G	A	G H	R H		H
Raltegravir <sup>cc</sup>	L 74	E 92	T 97	E 138	G 140	Y 143	Q 148
	M Q	Q A	A	A K	A S	R H	N H
					C	K R	

<sup>38</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> (Consulté le 02/03/2013).

<sup>39</sup> <http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/HIVdb.html> (Consulté le 02/03/2013).

<sup>40</sup> <http://regaweb.med.kuleuven.be/> (Consulté le 02/03/2013).

**Tableau V : Mutations associées à la résistance aux INTI et aux INNTI  
(Johnson VA et coll., 2013).**

**MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS**

**Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)<sup>a</sup>**

Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex<sup>b</sup> (affects all nRTIs currently approved by the US FDA)

M	A	▼	K	L	T	K
41	62	69	70	210	215	219
L	V	Insert R		W	Y	Q
				F	E	

Multi-nRTI Resistance: 151 Complex<sup>c</sup> (affects all nRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

A	Y	F	F	Q	L	T	K
62	75	77	116	151	210	215	219
V	I	L	Y	M	W	Y	Q
					F	E	

Multi-nRTI Resistance: Thymidine Analogue-Associated Mutations<sup>d,e</sup> (TAMs; affect all nRTIs currently approved by the US FDA)

M	D	K	L	T	K
41	67	70	210	215	219
L	N	R	W	Y	Q
			F	E	

Abacavir <sup>g,h</sup>	K	L	Y	M
	65	74	115	184
	R	V	F	V

Didanosine <sup>g,h</sup>	K	L		
	65	74		
	R	V		

Emtricitabine	K		M
	65		184
	R		V
			I

Lamivudine	K		M
	65		184
	R		V
			I

Stavudine <sup>d,g,h,k</sup>	M	K	D	K	L	T	K
	41	65	67	70	210	215	219
	L	R	N	R	W	Y	Q
					F	E	

Tenofovir <sup>i</sup>	K		K				
	65		70				
	R		E				

Zidovudine <sup>d,g,h,k</sup>	M	D	K	L	T	K
	41	67	70	210	215	219
	L	N	R	W	Y	Q
				F	E	

**Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)<sup>a,m</sup>**

Efavirenz	L	K	K	V	V	Y	Y	G	P	M
	100	101	103	106	108	181	188	190	225	230
	I	P	N	M	I	C	L	S	H	L
			S			I		A		
Etravirine <sup>n</sup>	V	A	L	K	V	E	V	Y	G	M
	90	98	100	101	106	128	179	181	190	230
	I	G	I*	E	I	A	D	C*	S	L
			H			G	F	I*	A	
			P*			K	T	V*	Q	
Nevirapine	L	K	K	V	V	Y	Y	G	M	
	100	101	103	106	108	181	188	190	230	
	I	P	N	A	I	C	C	A	L	
			S	M		I		H		
Rilpivirine <sup>o</sup>	K			E		V	Y	Y	H	F M
	101			128		179	181	188	221	227 230
	E			A		L	C	L	Y	C I L
				G			I			
				Q			V			
				R						

**Tableau VI : Mutations associées à la résistance aux IP (Johnson VA et coll., 2013).**

		MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS <sup>par</sup>																	
Atazanavir +/- ritonavir <sup>a</sup>	L I F V C V	G E M I T L	K R F I T V	L Q F V T V	L I L Y M T A	V 32 33 34 36	E I Y L Y M T	M 46 48 50 53 54	I Y L L Y M V	F I I F T A	I 50 52 53 54	D E Y L Y M V	I 60 62 64 71 73	A Y L V T L	G 71 73 74 76	V 82 84 74 76	I 84 85 88	N 88 90 93	L M L F I L
Darunavir/ ritonavir <sup>b</sup>	V I	V I	L F	V L	I V	47 32 33	I V	50 52 53 54	I V M L	T P V	L 74 76	T 74 76	L 84 89	I V	V V	I V	N 89	L V	
Fosamprenavir/ ritonavir	L I R V	V I L	V I V	M I V	I I V	32 46 47	M 50 54	I I V	I L	G S V	L 73 76	V 82	I 84	V 90	I A F S T	V 82	I 84	L 90	
Indinavir/ ritonavir <sup>a</sup>	L I R V	K M R V	L I I	V 32	M 36	20 24	46	I 54	V V	A V T A	G 71 73 76 77	L 82	V 84	I 90	V A F T	V 82	I 84	L 90	
Lopinavir/ ritonavir <sup>b</sup>	L I R V	K M R V	L I I	V L	M I F I	20 24 32 33	46 47	50 52 53 54	V L V L	L P T	A 71 73 76	G 82	L 84	V 90	V A F T S	V 82	I 84	L 90	
Nelfinavir <sup>**</sup>	L F I	D N I	M I	M I	M I F I	30	46	50 53 54	V L V L	A 71 73 77	V 82	V 84	I 88	N 90	V A F T S	V 82	I 84	N 90	
Saquinavir/ ritonavir <sup>a</sup>	L I D	L I D	M I	M I	G I I	24	48	54	V Y I	A 71 73 77	G 82	V 84	I 88	L 90	V A F T S	V 82	I 84	N 90	

#### IV.2.2.1 Mutations associées aux inhibiteurs de fusion

Les mutations de résistance aux IF sont localisées entre les codons 36 et 45 situées dans le site de liaison de l'Enfurvitide. Elles sont constituées des mutations G36D/S, I37V, V38A/M/E, Q39H/R, Q40H, N42T et N43D (**Conf. tableau IV**).

Une seule mutation de résistance liée aux IF suffit généralement à réduire de l'ordre de 10 fois la sensibilité à la molécule, alors que cette proportion passe à environ 100 avec deux mutations (**Melby T et coll., 2006 ; Su C et coll., 2006**).

Les preuves que les souches de VIH résistantes à l'Enfurvitide répliquent moins bien que les souches sensibles ont été rapportées par des études de compétition *in vitro* (**Lu J et coll., 2004**) et études sur des patients en arrêt de traitement montrant une réversion rapide à 16 semaines chez la plupart des individus (**Deeks S et coll., 2007**).

Par ailleurs, il a été rapporté par plusieurs études que les mutations accessoires situées en dehors du site de liaison à l'enzyme (N126K, N137K et S138A), lorsqu'elles sont associées aux mutations en position 36-45 amélioreraient le fitness viral (**Su C et coll., 2006 ; Tolstrup M et coll., 2007 ; Wood MP et coll., 2013**).

#### **IV.2.2.2 Mutations associées aux inhibiteurs de l'intégrase**

Il s'agit d'une classe d'ARV qui a fait l'objet de beaucoup d'essais cliniques depuis son apparition en 2007 (**Santos AF et Soares MA, 2010**). En association aux INRT, elle ouvre la perspective sur de nouvelles stratégies de traitements à prise unique prometteuses pour une large utilisation dans les traitements de première ligne ou chez des patients en échec thérapeutique (**Messiaen P et coll., 2013**). La majorité des mutations qui leurs sont associées sont localisées au niveau de leur site de liaison à l'enzyme. Certaines d'entre-elles peuvent diminuer par elles-mêmes la sensibilité aux ARV, tandis que d'autres en association avec certaines mutations de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase présentent un effet compensateur de la baisse du fitness viral (**Lataillade M et coll., 2007**).

Il semblerait que l'intégrase présente autant de polymorphisme naturel que la protéase, mais les mutations de polymorphisme conduisant à une résistance de haut niveau y sont rarement, voire jamais observées chez les patients naïfs de traitements (**Low A et coll., 2009**). Cependant, l'activité de l'intégrase et la réPLICATION virale sont affectées par les différentes mutations qui lui sont associées (**Lu R et coll., 2004 ; Delelis O et coll., 2009**).

Pour le Raltegravir 3 voies ou profils de mutations conférant un niveau de résistance élevé, existent (**Malet I et coll., 2008 ; Delelis O et coll., 2009 ; Ni XJ et coll., 2011**).

Les deux voies les plus fréquemment rencontrées sont constituées par la mutation N155H associée à (L74M, E92Q ou G163R) et la mutation Q148H/R/K associée à G140A/S (**Malet I et coll., 2008**). Comparée à la voie Q148H/R/K, la voie N155H exposait à plus de réduction de la sensibilité au Raltegravir et présenterait de ce fait une plus grande capacité répllicative (**Fransen S et coll., 2012**).

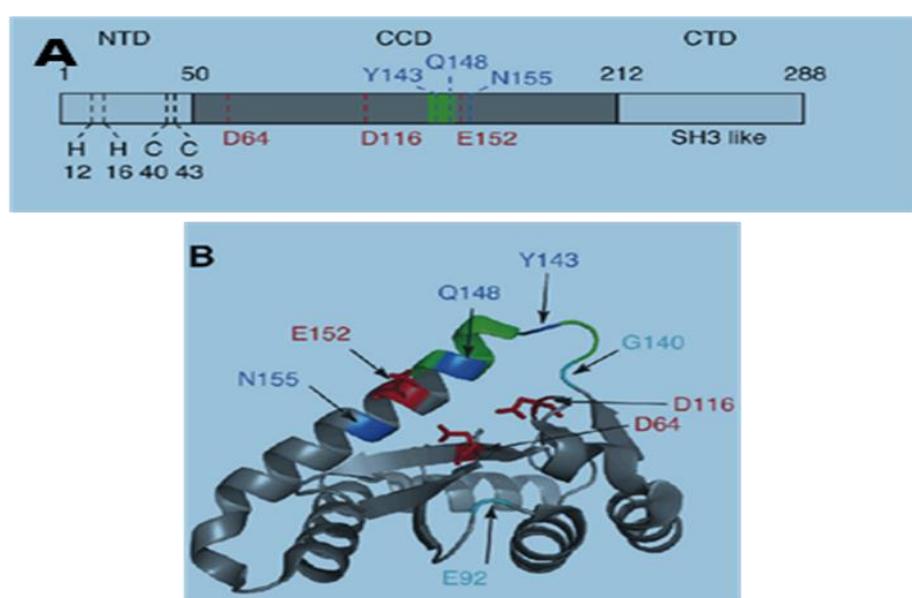
A côté de ces deux voies, d'autres mutations sélectionnées *in vivo* ou *in vitro*, polymorphiques (T97A et V151I) ou non polymorphiques (L74R, E138A/K, N155S, H183P, Y226D/F/H, S230R et D232N ont également été rapportées pour la molécule (**Malet I et coll., 2008 ; Delelis O et coll., 2009 ; Fransen S et coll., 2009**).

La 3ème voie de résistance moins fréquente et de survenue plus tardive est constituée par la mutation Y143R/C/H souvent associées aux mutations E92Q et T97A (**Quercia R et coll., 2009 ; Blanco JL et coll., 2011 ; Ni XJ et coll., 2011**).

La mutation Y143G qui interférerait avec la fin du processus de transcription inverse n'a aucun effet sur le transport nucléaire. Par contre elle aurait un léger effet sur l'intégration et serait de ce fait liée à un taux de réPLICATION plus faible (**Tsurutani N et coll., 2000 ; Delelis O et coll., 2010**).

La voie N155 est généralement celle observée la première au début de l'évolution de la résistance au Raltegravir. Elle est par la suite remplacée dans la plupart des cas, par des mutations appartenant à la voie Q148 ou à la voie Y143 (**Quercia R et coll., 2009**). Enfin, en présence de N155H, Y143C diminuerait le niveau de résistance à l'intégrase, ce qui laisserait supposer que ces deux mutations ont des effets antagonistes (**Ni XJ et coll., 2011**).

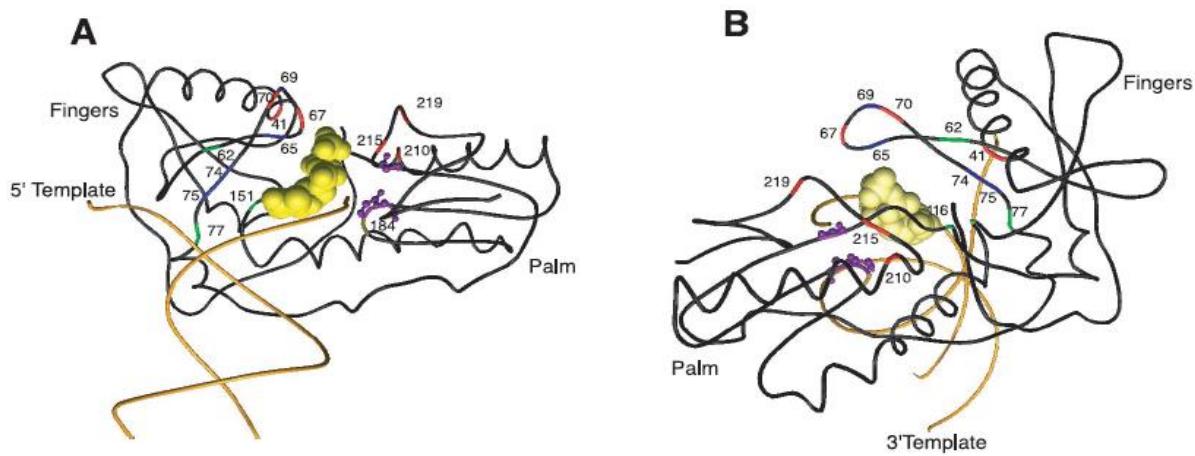
L'Elvitégravir présente un profil de mutations de résistance commun au Raltegravir (E92Q, E138K, Q148H/R/K et N155H), impliquant un taux important de résistance croisée entre les deux molécules (**Blanco J-L et coll., 2011**). A côté de cela, l'Elvitégravir est associé à des mutations primaires qui lui sont propres (T66I/A/K et S147G) pouvant chacune isolément entraîner une baisse de sa sensibilité (**Shimura K et coll., 2008 ; Metifiot M et coll., 2010 ; Blanco J-L et coll., 2011**).



**Figure 25 : Structure de l'intégrase montrant les positions de mutations majeures conférant la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase (Metifiot M et coll., 2010)**

#### IV.2.2.3 Mutations associées aux INTI

Elles regroupent la mutation M184V, les mutations liées aux analogues de la thymidine (TAM, pour thymidine analog mutations), les mutations liées aux schémas thérapeutiques ne contenant pas les analogues de la thymidine, les mutations entraînant des résistances multiples aux INTI et plusieurs mutations accessoires non polymorphiques (**Shafer RW et Schapiro JM, 2008**).



**Figure 26 : Modèle structural représentant la TI du VIH-1 cristallisée avec un INTI et les mutations de résistance aux INNTI (Shafer RW, 2002).**

Les grosses boules dorées représentent la molécule ARV. Les positions liées à la résistance aux INTI sont représentées par de petites boules violettes et des traits colorés en vue de face (A) et par derrière (B)

- M184V

Il s'agit de la plus fréquente mutation associée à la résistance aux INTI (**Shafer RW et Schapiro JM, 2008 ; Sharma PL et coll., 2009**). Elle se produirait seule dans 17,4% des séquences mutantes (**Rhee S et coll., 2004**). *In vitro*, elle entraîne une résistance croisée et de haut niveau au 3TC et FTC, une résistance de bas niveau pour la ddI et ABC et une augmentation de la sensibilité à l'AZT, d4T et TDF (**Whitcomb JM et coll., 2003 ; Trivedi V et coll., 2008**). La signification clinique et phénotypique de la mutation M184V est influencée par la présence ou pas d'autres mutations de résistance aux INTI. C'est ainsi qu'elle montre une sensibilité accrue au Ténofovir associée à la K65R (**White KL et coll., 2002**), alors qu'avec la même mutation K65R ou L74V, la M184V entraîne une résistance croisée et de haut niveau à l'ABC et au ddI (**White KL et coll., 2002 ; Rhee S et coll., 2004**). En revanche, un minimum de trois TAM associés à la M184V sont requises pour entraîner une résistance de haut niveau à l'ABC et au ddI (**Whitcomb JM et coll., 2003 ; Lanier ER et coll., 2004 ; Rhee S et coll., 2004 ; Marcelin AG et coll., 2005**).

L'Apricitabine, nouvelle molécule de la classe des INTI constitue une bonne alternative pour les patients présentant la mutation M184V seule ou en association avec des TAM (**Chan P et coll., 2011**).

- Mutations liées aux analogues de la thymidine (TAM)

Les TAM sont sélectionnées par les analogues de la thymidine (AZT et d4T). Ils diminuent la sensibilité de ces INTI et dans une moindre mesure celle de l'ABC, du ddI et du TDF (**Whitcomb JM et coll., 2003**). L'accumulation de TAM se fait selon 2 profils distincts mais chevauchants (**Marcelin A et coll., 2004** ; **Cozzi-Lepri A et coll., 2005**). **i)** Le profil I inclut les mutations M41L, L210W et T215Y. **ii)** Le profil II comprend les mutations D67N, K70R, K219Q/E et parfois T215F (**Cozzi-Lepri A et coll., 2005**).

Le profil I, plus que le profil II, entraîne une résistance croisée à ABC, ddI et TDF et provoque une hausse des niveaux de résistance phénotypique et clinique pour les analogues de la thymidine. Par ailleurs, la combinaison de la mutation secondaire R284K et le profil TAM I est responsable d'une résistance de haut niveau au Ténofovir et l'Emtricitabine, dévoilant un nouveau mécanisme par lequel les mutations secondaires sont sélectionnées dans le cadre des mutations de résistance aux ARV (**Betancor G. et coll., 2012**). L'importance clinique du profil II est moins bien élucidée.

D'autres mutations dans plusieurs positions TAM sont communes. Les plus courantes sont les révertants T215 partielle T215C/D/E/I/S/V (**Yerly S et coll., 1998**) ; K219N/R et K70E/G qui ont un effet phénotypique totalement opposé à celles de K70R, diminuant la sensibilité à ABC, ddI, TDF, 3TC, FTC et augmentant celle de l'AZT (**Sluis-Cremer N et coll., 2007** ; **Bradshaw D et coll., 2007**).

Les mutations les plus rencontrées chez les patients présentant un échec virologique dans un régime sans analogues de la thymidine comprennent la M184V isolée ou en association avec K65R ou L74V/I (**Moyle G et coll., 2005** ; **Gallant JE et coll., 2006** ; **McColl DJ et coll., 2008**). K65R entraîne une résistance intermédiaire à TDF, ABC, ddI, 3TC et FTC, une résistance de bas niveau au d4T et une susceptibilité accrue à AZT (**Antinori A et coll., 2007**). Il a été proposé que son émergence précède celle de K70E qu'elle remplace et qui partage avec elle, le même profil de résistance (**Van Rompay KK et coll., 2007**).

L74V/I entraîne une résistance intermédiaire à la ddI et ABC et une légère augmentation de la sensibilité à l'AZT et au TDF (**McColl DJ et coll., 2008** ; **Trivedi V et coll., 2008**). Même si K70R et T215F étaient les plus fortement liées à un risque élevé de sélection de la L74I, cette mutation se trouve associé à des TAM multiples peut-être du fait d'une augmentation moindre de la sensibilité à l'AZT et au TDF (**Wirden M et coll., 2006**).

- Mutations associées à des résistances multiples aux INTI

C'est le cas :

- des insertions d'acides aminés au niveau du codon 69 de la TI. Associée à une résistance intermédiaire à la 3TC et FTC et une résistance de haut niveau à l'AZT, 3TC, d4T et ABC. Cette insertion se produit généralement en présence de TAM multiples (**Masquelier B et coll., 2001**).
- de la mutation Q151M à 2-PB (CAG → ATG), habituellement accompagnée d'au moins deux des mutations suivantes : A62V, V75I, F77L, F116Y (**Zaccarelli M et coll., 2004** ; **Shafer RW et Schapiro JM, 2008** ; **Mohamad S et coll., 2012**). Le complexe Q151M sélectionnée après plusieurs lignes de traitement comportant des analogues nucléosidiques confère une résistance de haut niveau à l'ensemble des autres analogues nucléosidiques de la RT à l'exception du TDF (**Harada S et coll., 2007** ; **Mbisa JL et coll., 2011**). Il est rarement sélectionné par les régimes contenant 3TC ou FTC. Ce complexe survenant rarement est observé chez moins de 5% des patients ayant reçu, la ddI en association avec l'AZT ou la d4T (**Van Vaerenbergh K et coll., 2000**).

- Autres mutations associées à la résistance aux INTI

Plusieurs mutations non polymorphes (K20R, T39A, K43E/Q/N, E203D/K, H208Y, D218E, H221Y, K223Q et L228H/R) généralement liées à des mutations majeures ont été décrites dans le domaine de la polymérase. C'est ainsi que les mutations T39A, K43EQN, E203KD et H208Y sont généralement associées au TAM. Ces mutations non polymorphes, ont des effets limités sur la sensibilité du VIH-1 aux INTI et sur la réPLICATION (**Saracino A et coll., 2006**).

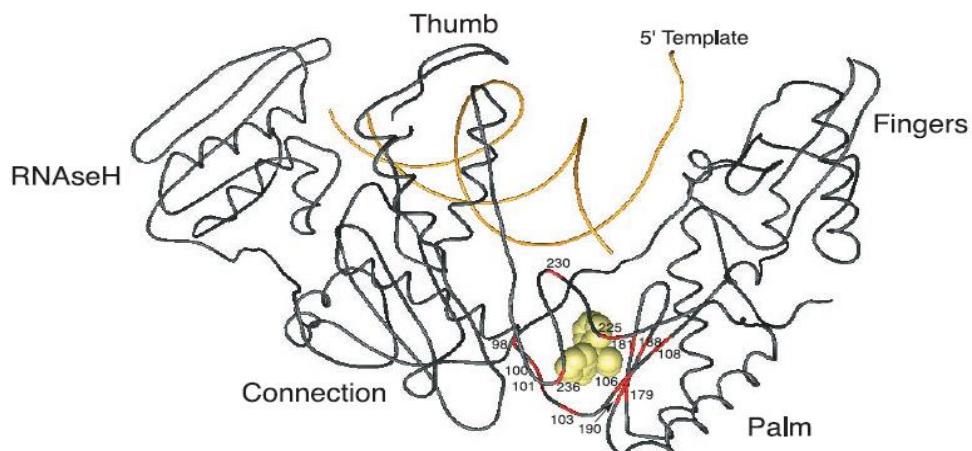
De nombreuses autres mutations ont également été décrites dans le domaine de connexion et le domaine RNaseH de la transcriptase inverse du VIH-1 (**Radzio J et coll., 2010** ; **Roquebert B et Leleu J, 2010**). Il s'agit de 20 substitutions différentes qui peuvent être présentes seules ou plus généralement en association avec des mutations de résistance «classiques» (**Roquebert B et Leleu J, 2010**).

Les mutations, associées aux TAM comme la N348I et la G333D, augmentent la résistance à l'AZT. Elles peuvent affecter la capacité de l'enzyme à reconnaître et à intégrer les analogues de nucléotides sur le site actif de l'ADN polymérase active et diminueraient ainsi la sensibilité aux INTI via 2 mécanismes :

- i) un changement conformationnel dans la région « pouce » qui se traduit par un ralentissement de l'activité polymérasique (**Zelina S et coll., 2008**) responsable d'une augmentation du temps d'excision des INTI (AZT et d4T) ; ii) une diminution de l'activité ribonucléasique provoquant le ralentissement de la dégradation du brin d'ARN matrice qui augmente ainsi le temps d'excision par la TI des INTI déjà incorporés (**Delviks-Frankenberry KA, 2007**).

#### IV.2.2.4 Mutations associées aux INNTI

Les INNTI sont caractérisés par une barrière génétique faible et seulement une à deux mutations leurs suffisent pour induire une résistance souvent croisée et de haut niveau (**Casado JL et coll., 2000** ; **Shafer RW, 2002** ; **Lecossier D et coll., 2005**). La majorité de ces mutations sont localisées dans la poche hydrophobe de liaison aux INNTI ou à proximité de celle-ci (**Sarafianos S et coll., 2004** ; **Ren J et coll., 2008**).



**Figure 27 : Modèle structural de la TI du VIH-1 cristallisée avec la Névirapine (boules jaunes) et les mutations de résistance aux INNTI (Shafer RW, 2002).**

Les positions liées à la résistance aux INNTI (en rouge) entourent la poche hydrophobe dans laquelle la Névirapine et les autres INNTI se lient.

#### 4 catégories de mutations de résistance aux INNTI existent :

- **Les mutations primaires** qui entraînent une résistance de haut niveau à un ou plusieurs INNTI. Elles sont les premières à se développer lors d'un traitement aux INNTI.
- **Les mutations secondaires** qui ont des conséquences cliniques de taille pour le choix de l'Etravirine. Elles se produisent généralement en combinaison avec les mutations primaires.
- **Les mutations mineures non-polymorphes** qui entraînent une diminution de la sensibilité aux INNTI. Elles surviennent seules ou en combinaison avec d'autres mutations de résistance aux INNTI.

- **Les mutations accessoires polymorphes** qui modulent les effets des autres mutations de résistance aux INNTI (**Shafer RW et Schapiro JM, 2008**).

#### Mutations primaires de résistance aux INNTI

Ce sont les mutations : K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H, G190A/S/E capable de provoquer chacune une résistance de haut niveau à la Névirapine et une résistance variable à l'Efavirenz (**Bacheler L et coll., 2001 ; Rhee S et coll., 2006**). Ces mutations sont sans effet sur l'Etravirine exception faites de celles en position 181 et dans une moindre mesure celles en position 190, susceptibles de compromettre la réponse à la molécule (**Madrigal JV et coll., 2007 ; Maiga AI et coll., 2010**). Associées, les deux mutations K103N et Y181C confèrent une résistance de haut niveau à la Névirapine et à la Délavirdine (**Casado JL et coll., 2000**).

#### Mutations secondaires majeures de résistance aux INNTI

Les mutations secondaires : L100I, K101P, P225H, F227L, M230L et K238T sont généralement associées aux mutations primaires de résistance aux INNTI. En présence de la K103N, les mutations L100I, K101P, P225H et K238T/N entraînent une baisse de la sensibilité à la NVP et à l'EFV (**Parkin N et coll., 2006 ; Rhee S et coll., 2006**). La F227L survient toujours en combinaison avec la V106A entraînant une baisse de la sensibilité à la NVP (**Balzarini J et coll., 1998 ; Zhang Z et coll., 2007**). La M230L qui peut survenir de façon isolée, diminue considérablement la sensibilité de tous les INNTI disponibles, y compris ceux de seconde génération comme l'Etravirine et la Rilpivirine (**Xu HT et coll., 2010 ; Anta L et coll., 2013**).

Les mutations V179F, F227C, L234I et L318F sont rares, mais connaissent une importance accrue depuis la mise sur le marché de l'Etravirine. Elles entraînent en association avec la mutation Y181C/I/V, une baisse de la sensibilité à l'Etravirine (**Anta L et coll., 2013 ; Harrigan PR et coll., 2002 ; Vingerhoets J et coll., 2005**). La mutation Y318F à elle seule, est suffisante pour conférer un haut niveau de résistance à la Délavirdine (**Harrigan PR et coll., 2002**).

#### Mutations mineures de résistance aux INNTI

A98G, K101E, V108I et V179D/E sont des mutations de résistance communes aux INNTI. Elles réduisent de 2 à 5 fois, la sensibilité à la Névirapine et l'Efavirenz (**Rhee S et coll., 2004**).

La K103R survient de façon isolée chez environ 1% des patients naïfs de tout traitement, mais elle ne présente aucun effet sur la sensibilité aux INNTI. Par contre, cette même mutation, réduirait considérablement la sensibilité à tous les INNRT actuellement approuvées lorsqu'elle se trouve associée à la V179D.

La V179D seule, réduirait d'environ 15 fois la sensibilité à la NVP et à l'EFV (**Parkin NT et coll., 2006**). Par ailleurs, la mutation V179D et rarement les mutations A98G et V108I peuvent être observées chez les patients naïfs de tout traitement aux INNTI (**Shafer R et coll., 2007 ; Derche A et coll., 2008**).

La mutation la plus commune émergeant au cours d'un traitement à base de Rilpivirine est la mutation E138K, qui se produit souvent en combinaison avec M184I. E138K est susceptible d'entraîner une résistance croisée aux autres INNTI limitant ainsi l'utilisation de cette classe (**Schafer JJ et Short WR, 2012**). La E138K serait responsable d'une diminution de la sensibilité à la Rilpivirine, mais vue sa barrière génétique élevée en comparaison aux INNTI de première génération, il y a nécessité de l'émergence de plusieurs mutations pour que la résistance soit effective (**Azijn H et coll., 2010 ; Wainberg MA, 2013**). La mutation M230L est une mutation rare qui se trouve souvent associée à la E138K chez les patients sous Rilpivirine (**Asahchop EL et coll., 2011**). Enfin, il a été démontré une résistance croisée entre la Rilpivirine à l'Etravirine (**Bunupuradah T et coll., 2011 ; Imaz A et coll., 2013**).

#### Mutations accessoires polymorphes de résistance aux INNTI

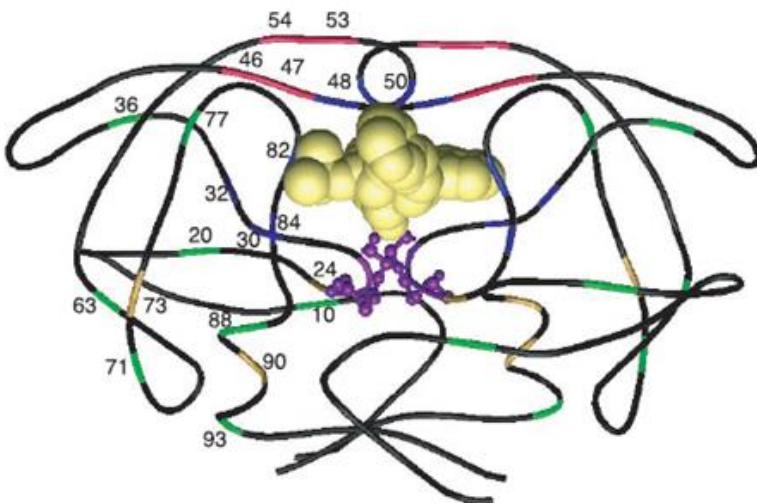
Plusieurs mutations très polymorphes de la TI, telles que la K101Q, I135T / M, V179I et la L283I, réduisent la sensibilité à la NVP et à l'EFV et peuvent agir en synergie avec les mutations primaires des INNTI (**Ceccherini-Silberstein F et coll., 2007 ; Gupta S et coll., 2011**).

D'autres mutations comme la L74V, H221Y, K223E/Q, L228H/R et N348I sont sélectionnées principalement par les INTI, mais peuvent entraîner également une réduction de la sensibilité aux INNTI (**Dykes C et Demeter LM, 2007 ; Yap SH et coll., 2012**). V90I et V106I sont des mutations très polymorphes qui sont associées à une réponse virologique diminuée à l'Etravirine (**Sungkanuparph S et coll., 2008**). Enfin, il existe des arguments de taille en faveur d'une hypersensibilité aux INNTI par les TAM, en particulier de type I (M41L / L210W / T215Y), (**Whitcomb J et coll., 2002 ; Shulman N et coll., 2004**).

#### **IV.2.2.5 Mutations associées aux inhibiteurs de la protéase**

Il s'agit de la classe d'ARV qui sélectionne le plus de mutations de résistance (**conf. tableau VI**). Ils existent deux classes de mutations de résistance liées au gène de la protéase : les mutations «majeures» survenant les premières, responsables d'une diminution importante de la capacité catalytique de la protéase et les mutations «mineures» ou accessoires survenant plus tardivement, responsables d'une diminution de l'affinité de la protéase pour l'IP.

Ces deux types de mutations sont habituellement acquis de façon graduelle par accumulation de plusieurs mutations. Certaines mutations mineures de polymorphisme sont communes aux souches du VIH-1 non-B et ne présentent aucun impact sur la résistance (**Doulla-Bell F et coll., 2004**).



**Figure 28 : Modèle structural des deux sous-unités de la protéase du VIH-1 (Shafer RW, 2002).** L'enzyme (positions 1 à 99) est présentée sous forme de squelette polypeptidique cristallisé avec l'Indinavir et les mutations de résistance aux IP. Le site actif (positions 25 à 27) est représenté sur les deux sous-unités sous forme de petites boules et traits colorés en violet. Les grosses boules dorées représentent l'IDV.

- Mutations majeures de résistance aux IP

Elles peuvent réduire la sensibilité aux IP administrés seuls ou en association avec d'autres IP. Ainsi, parmi les mutations liées aux IP, certaines peuvent entraîner la baisse de la sensibilité avec la modification d'un seul acide aminé. C'est le cas des mutations : M46I/L associée à la résistance à l'IDV, D30N associée à la résistance au NFV, I47A associée à la résistance au LPV, I50V associée à la résistance au FPV et la I50L associée à la résistance à l'ATZ. D'autres mutations peuvent induire une résistance croisée aux IP. C'est le cas de la mutation l'I84A/V, responsable d'une résistance à l'IDV et au NFV.<sup>41</sup> Pour d'autres molécules, singulièrement les IP de 2ème et 3ème génération à barrière génétique élevée, l'accumulation de plusieurs mutations est nécessaire pour l'expression d'une résistance. Ce sont les exemples du :

- LPV nécessitant parmi les mutations : L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V et L90M, au moins 4 à 5 pour l'acquisition d'une résistance intermédiaire et au moins 6 pour l'acquisition d'une résistance totale.

<sup>41</sup><http://www.hivfrenchresistance.org/2012/Algo-sep-2012.pdf> (Consulté le 29/09/2013).

- DRV nécessitant parmi les mutations : V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V, 3 pour l'acquisition d'une résistance intermédiaire et au moins 4 pour l'acquisition d'une résistance totale.<sup>42</sup>

Plusieurs mutations sont associées à une sensibilité accrue à un ou plusieurs IP. C'est le cas de la mutation I50L, qui augmente la susceptibilité de tous les IP à l'exception de l'Atazanavir (**Colombo R et coll., 2004**), de la mutation L76V qui augmente la sensibilité à l'Atazanavir, au Saquinavir et au Tipranavir (**Wiesmann et coll., 2011 ; Tartaglia A et coll., 2009**), la mutation I50V qui augmente la sensibilité au Tipranavir et à l'Atazanavir (**Elston R et coll., 2006**), la mutation I54L qui augmente la sensibilité au Tipranavir (**Talbot A et coll., 2010**) et la mutation N88S qui augmente la sensibilité au Fosamprenavir (**Ziermann R et coll., 2000**).

- *Mutations mineures ou accessoires de résistance aux IP*

Elles peuvent survenir à de différents endroits du site actif de l'enzyme et peuvent avoir un impact sur son architecture moléculaire et sa stabilité (**Ala PJ et coll., 1998**).

Ces mutations réduisent la sensibilité aux IP, quand elles sont associées à d'autres mutations de résistance aux IP ou compensent les défauts de réplication liés à d'autres mutations de résistance. Ce sont les mutations aux positions 10, 36, 63 très polymorphes et les mutations aux positions 20 et 71 qui améliorent la processivité de la Protéase afin de compenser la diminution du fitness des souches présentant des mutations majeures de résistance (**Mammano F et coll., 1998 ; Hoffman NG et coll., 2003 ; van Maarseveen N et coll., 2006**)

Les autres mutations accessoires sélectionnées par les IP peuvent être polymorphiques : mutations I13V, D60E, I62V, V77I et I93L, ou non-polymorphiques et peu communes : mutations V11I, E34Q, E35G, K43T, K45I, K55R, Q58E, T74P/A/S, V75I, N83D, P79A / S, I85V, L89V, T91S, Q92K et C95F23 (**Wu TD et coll., 2003 ; Svicher V et coll., 2005 ; Rhee SY et coll., 2005**). Plusieurs de ces mutations non-polymorphes ont été utilisés pour définir les scores de sensibilité génotypique au TPV/r (E35G, K43T, Q58E, T74P et N83D) et au DRV/r (V11I, T74P, et L89V). Par ailleurs, l'accumulation des mutations en fonction de la molécule concernée (TPV/r, DRV/r) est associée à une sensibilité réduite à l'IP en question. (**Baxter JD et coll., 2006 ; de Meyer S et coll., 2008 ; Stürmer M et coll., 2011**). Les effets sur d'autres IP de ces mutations n'ont pas été évaluées.

---

<sup>42</sup><http://www.hivfrenchresistance.org/2012/Algo-sep-2012.pdf> (Consulté le 29/09/2013).

Cependant, il a été rapporté que leur présence avant l'initiation d'un traitement antirétroviral est corrélée à une sensibilité réduite aux premières générations d'inhibiteurs de protéase (**de Meyer S et coll., 2008**).

- Mutations au niveau des sites de clivage de Gag

IL a été montré une association entre des mutations telles que A431V ou I437V situées sur les sites de clivage au niveau de la région NC-SP2-p6 de gag et des mutations au niveau de la protéase (**Maguire MF et coll., 2002 ; Dam E et coll., 2009 ; Kolli M et coll., 2009**).

C'est ainsi que la mutation A431V, située dans le site de clivage p7/p1, a été décrite comme pouvant être associée aux mutations de résistance M46I/L, V82A/F/T ou I54V liées à la protéase, alors que les mutations S373Q et L449P situées à deux endroits différents de sites de clivage de Gag ont été associées aux mutations de la protéase K20I/R/M et L89M/I (**Malet I et coll., 2007 ; Kolli M et coll., 2009**). Les mutations liées aux sites de clivage sont plus fréquentes chez les patients traités que chez les patients naïfs, ce qui laisse supposer qu'elles seraient soumises à la pression de sélection (**Banke S et coll., 2009**).

Un virus présentant à la fois des mutations sur le gène de la protéase et au niveau des sites de clivage de *gag*, par opposition à un virus muté uniquement au niveau de la protéase, permet une récupération partielle de la capacité réplicative du virus par augmentation du clivage des précurseurs Gag et Gag-pol, (**Zhang YM et coll., 1997 ; Maguire MF et coll., 2002 ; Parry CM et coll., 2009**). Parallèlement à cela, il a été démontré que des changements dans les sites de clivage de Gag, en particulier en région NC/p1, peuvent compenser les défauts de la capacité réplicative d'une protéase résistante, comme ils peuvent à l'inverse contribuer à la résistance aux IP (**van Maarseveen NM et coll., 2012**).

Enfin, comme les mutations liées aux IP, les mutations au niveau des sites de clivage de gag retrouvées de façon isolées, peuvent se comporter comme des mutations de résistance mineure et réduiraient ainsi l'activité catalytique de la protéase (**Nijhuis M et coll., 2007 ; Banke S et coll., 2009 ; Dam E et coll., 2009**). Néanmoins, ces mutations et particulièrement celles situées en région MA-CA-SP1 de Gag peuvent avoir un impact positif sur la réponse au traitement antirétroviral à base d'IP (**Dam E et coll., 2009**).

- Mutations de résistance aux IP spécifiques de sous-types

Les IP sont autant efficaces sur les souches B que sur les souches non-B. Ceci a été confirmé par un grand nombre d'études *in vivo* (**Rhee S et coll., 2006**). Cependant, les mutations de polymorphisme (I13V, K20I, M36I et I93L) spécifiques des souches non-B peuvent survenir au niveau de points de mutations accessoires des sous-types B (**Parkin N et coll., 2004 ; Santos AF et Soares AM, 2010**).

Habituellement, le mécanisme d'acquisition de la résistance ne varie pas en fonction du sous-type ; mais quelques exceptions échappent à cette règle (**Wainberg MA et Brenner BG, 2012**). C'est le cas de la mutation D30N survenant plus chez les souches de sous-type B (**Cane P et coll., 2001 ; Santos AF et Soares MA, 2011**), la mutation N88S émergeant plus chez le sous type CRF01\_AE après un traitement au NFV (**Ariyoshi K et coll., 2003**), les mutations L90M, le plus souvent rencontrée chez les sous-types C et F (**Cane P et coll., 2001 ; Calazans A et coll., 2005**). Enfin on peut citer les exemples de la mutation L89V prédominante dans le sous type CRF02\_AG (**Santoro MM et coll., 2012**) et la mutation T74P associée à la résistance au TPV et responsable d'une réduction de la sensibilité au NFV, principalement retrouvée dans le sous-type C et plus rarement au niveau des autres sous-types (**Rhee S et coll., 2006 ; Santoro MM et coll., 2012**).

#### IV.2.3 Surveillance de la transmission de la résistance aux ARV

La transmission de virus d'embrlée résistants peut influencer négativement l'efficacité des traitements de première ligne. Elle est responsable d'un échec virologique précoce (**Chaix ML et coll., 2007**). Ainsi, les patients nouvellement mis sous ARV porteurs de virus d'embrlée résistants débutent leur traitement avec des chances de succès thérapeutiques réduites. Ceci est liée à, la modification de la barrière génétique des molécules qui devient plus faible avec des risques certains d'échec virologique et de développement de la résistance, même aux molécules pour lesquelles la souche était sensible. Il en découle des options de traitement initial limités et des réponses sous-optimales aux ARV administrés (**Little SJ et coll., 2002 ; Daar ES et coll., 2005**).

La transmission de souches résistantes constitue un réel problème de santé publique, particulièrement pour les pays à faibles ressources, du fait du nombre limité d'ARV de 1<sup>ère</sup> ligne, voire le nombre limité ou non disponibilité des molécules de 2<sup>ème</sup> ligne. Afin de limiter le problème par une réduction de l'émergence et transmission de souches résistantes, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a élaboré une stratégie simplifiée de détermination et surveillance des seuils de résistance aux ARV pour (HIVDR-TS : HIV drug resistance threshold survey).

Pour la mise en œuvre de ces stratégies, l'OMS renforce les capacités locales des pays et les accompagnent dans la mise en œuvre, l'évaluation et l'exploitation des résultats d'enquêtes (**Bennett D et coll., 2008**). Les enquêtes sont généralement menées dans les services de consultation prénatale ou services de dépistage volontaire du VIH (**Somi GR et coll., 2008 ; Nguyen HT et coll., 2008**).

Les critères d'inclusion sur lesquelles se basent cette surveillance sont : sujets jeunes d'âge < 25 ans (idéalement < 22 ans) de préférence des femmes enceintes, sélectionnées à leur première grossesse ou sujets récemment infectés avec premier risque estimé d'infection par le VIH sur une période ne dépassant pas les 3 dernières années (si possible) ou sujets avec un taux de CD4>500 cellules/ $\mu$ l.<sup>43</sup> Pour faciliter l'interprétation des résultats générés dans le cadre de ce programme, l'OMS a établi une liste standard de mutations de résistance aux drogues à surveiller (ou SDRM : Surveillance Drug Resistance Mutations) ([http://cpr.stanford.edu/cpr/lists/sdrm\\_2009](http://cpr.stanford.edu/cpr/lists/sdrm_2009)) afin de caractériser l'épidémiologie de la résistance transmise sur la base de 4 critères (**Shafer RW et coll., 2007 ; Bennet D et coll., 2009**). Ces mutations doivent : **i)** être reconnues par au moins 3 listes d'experts comme associées à la résistance, **ii)** être non polymorphiques chez les patients non traités, **iii)** être applicables aux 8 sous-types et CRF les plus fréquents : A, B, C, D, F, G, CRF01\_AE et CRF02\_AG. **iiii)** exclure les mutations très rarement liées à une pression de sélection.

Selon le rapport OMS de 2012 sur la résistance du VIH aux ARV, le taux de résistance transmise dans les pays à faibles ressources était de 6,6%.<sup>44</sup> Cependant des disparités régionales ont été observées. Ces prévalences étaient respectivement de 5,7% en Afrique, 7,6% en Asie pour atteindre 8,4% au Brésil. La classe d'ARV la plus touchée par cette résistance transmise était les inhibiteurs non nucléosidiques de la RT et la moins touchée celle des IP, certainement du fait que les traitements de première ligne soient majoritaires dans les pays à faibles ressources<sup>45</sup>. Dans un contexte de passage à l'échelle des ARV caractérisé pour les pays à faibles ressources par un problème d'accès aux molécules de deuxième ligne, un intérêt de plus en plus grandissant est accordé à la gestion de la résistance. Ceci a amené l'OMS à développer en 2012 des stratégies plus globales sur la surveillance et le monitoring de la résistance aux ARV. Ainsi en plus des enquêtes de surveillance de la résistance transmises conduites auprès de patients nouvellement contaminés et le suivi des indicateurs d'alerte précoce (IAP), 3 stratégies supplémentaires sont recommandées :

- surveillance de la résistance aux ARV chez les enfants de moins de 18 mois (à travers les programmes de PTME),

<sup>43</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768_eng.pdf) (Consulté le 12/12/2013).

<sup>44</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75183/1/9789241503938\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75183/1/9789241503938_eng.pdf) (Consulté le 12/07/2013).

<sup>45</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> (Consulté le 12/07/2013).

- surveillance de la résistance aux ARV chez les patients initiant leur traitement ARV (J0 de mise sous ARV) et
- surveillance de la résistance acquise chez les patients sous ARV à 12 et 24 mois de traitement (à travers des études transversales)<sup>46</sup>.

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

La résistance aux ARV peut être évaluée par les tests génotypiques ou les tests phénotypiques (**Yeni P, 2010**).

Les tests génotypiques analysent et identifient sur le génome viral des mutations conférant une résistance. Ces mutations sont détectées par des techniques de biologie moléculaire (PCR, sondes nucléiques, séquençage).

Les tests phénotypiques quant à eux permettent de définir le caractère sensible ou résistant du virus mis en culture avec différentes concentrations de l'antiviral à tester. Les concentrations de molécules généralement utilisées sont celles inhibitrices de la réPLICATION virale à 50 % ou à 90%.

#### **IV.3.1 Les tests génotypiques**

Ils sont destinés à mettre en évidence les mutations associées à la résistance aux différents antirétroviraux au sein de la population virale. La détermination du génotype de résistance par la réalisation de la séquence complète des gènes à étudier est devenue la technique de référence pour le monitoring en routine des patients sous traitement ARV. Elle permet de déterminer le caractère sauvage, muté ou mixte (coexistence d'une double population virale sauvage et mutée) des codons à certaines positions des gènes cibles de la thérapeutique antirétrovirale (**Damond F et Descamps D, 1998**).

##### **IV.3.1.1 Le séquençage nucléotidique**

C'est la technique référence d'étude de la résistance aux ARV. Après une rétrotranscription de l'ARN viral plasmatique en ADNc et son amplification par PCR, on procède au séquençage direct du produit d'amplification selon la technique de Sanger. Des séquenceurs automatiques, permettent la lecture des séquences nucléotidiques par migration électrophorétique.

Après traduction avec des logiciels spécifiques, la séquence nucléotidique correspondante est comparée à une séquence de laboratoire référence de sous-type B (HxB2), pour rechercher d'éventuelles mutations de résistance (**Wagner TA et Frenkel LM, 2006**).

---

<sup>46</sup>[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768_eng.pdf) (Consulté le 13/11/2013).

Deux kits de séquençage incluant un logiciel d'analyse des profils de mutations sont actuellement disponibles : les kits des firmes Visible Genetics (Trugene® HIV-1 genotyping kit) de SIEMENS et Viroseq Genotyping system (Celera/Abbott Laboratories) qui ont reçu l'agrément d'utilisation par la Food and Drug Administration aux Etats-Unis (FDA). Ces deux kits donnent des résultats concordants dans 97,8 % des cas analysés. L'utilisation de ces techniques commerciales validées à partir du sous-type B, dans les pays en voie de développement ou les sous types non-B prédominent, nécessite une évaluation en continue par comparaison aux techniques « maisons» qui seraient plus adaptées aux souches non-B (**Chen JH et coll., 2007**). En effet, une étude menée au Cameroun, avait montré une différence de performance du Viroseq sur des souches non B en lien avec des différences de polymorphisme entre les souches B et sous types non B du VIH-1 (**Aghokeng AF et coll., 2011**).

A côté de ces techniques commerciales, bon nombre de laboratoires utilisent les techniques dites « maison ». Parmi celles-ci on peut citer celle du groupe de Résistance AC11 de l'ANRS<sup>47</sup>, celle de l'IRD (**Vergne L et coll., 2000**) et celle décrite par Djoko et collaborateurs en 2011 (**Djoko CF et coll., 2011**). Pour ces techniques maison, l'analyse des mutations est réalisée grâce aux algorithmes établis par des panels d'experts tels que celui du HIV French Resistance de l'ANRS<sup>48</sup>, Stanford HIVdb program<sup>49</sup> ou la liste de l'IAS<sup>50</sup>. Les résultats rendus renseignent sur le sous-type et les mutations de résistance avec leur interprétation (résistance, résistance possible ou sensible) par antiviral. Par ailleurs, ils informent sur les mutations de polymorphisme. Après interprétation, il est possible de calculer le GSS (genotypic sensitivity score) qui représente la somme des médicaments actifs selon l'algorithme utilisé. Bracciale et collaborateurs ont montré la prédictivité de ce score pour la réponse thérapeutique (**Bracciale L et coll., 2009**). En plus d'être mieux adaptées aux souches non B, les techniques maison ont l'avantage de permettre la recherche de mutations sur des cibles plus larges à un coût moindre.

Le séquençage, technique génotypique standard ne permet pas d'analyser les variants minoritaires. La technique ne prend en compte que la population virale majoritaire représentant plus de 20% de la population virale totale circulante dans le plasma (**Yeni P, 2010**).

La technique de pyroséquençage à haut débit permet la possibilité d'un séquençage massif en parallèle avec des coûts comparables au séquençage conventionnel. Elle offre par ailleurs des opportunités d'applications permettant de détecter des variants minoritaires, en particulier bénéfiques à la surveillance de la résistance transmise (**Ji H et coll., 2010**).

<sup>47</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> (Consulté le 12/07/2013).

<sup>48</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> (Consulté le 12/07/2013).

<sup>49</sup> <http://hivdb.stanford.edu/> (Consulté le 12/07/2013).

<sup>50</sup> [http://www.iasusa.org/resistance\\_mutations/mutations\\_Figures.pdf](http://www.iasusa.org/resistance_mutations/mutations_Figures.pdf) (Consulté le 12/07/2013).

Cette technique est commercialisée sous le nom 454 Life Sciences de Roche (Basel, Switzerland). A Côté d'elle, on peut citer la technique Solexa/Génome Analyser d'Illumina (San Diego, California, USA) et la technique SoLiD d'Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA) (**Conf. Chapitre III.3.1.1.1.2**). Ces techniques de séquençage ultrasensibles à haut débit constituent un nouveau challenge en bioinformatique par leur grande capacité à fournir des données en temps réel et le risque assez limité de survenue des erreurs, comparées au séquençage classique par la technique de Sanger (**Balzer S et coll., 2010 ; Armenia D et coll., 2012**).

#### **IV.3.1.2 Les techniques alternatives**

Il existe des techniques alternatives de génotypage qui permettent la détection des points de mutations ponctuelles spécifiques même si elles sont présentes à de très faibles concentrations. IL s'agit de :

##### *Tests d'hybridation du produit de PCR avec des sondes immobilisées sur des bandelettes de nitrocellulose*

Elles n'analysent que certains codons. C'est le cas de la technique commerciale INNO-LiPA HIV-1 RT (**Stuyver L et coll., 1997 ; Servais J et coll., 2002**). Même s'ils donnent de bonnes concordances variant parfois entre 91 et 98% en comparaison aux tests de séquençage nucléotidique (**Servais J et coll., 2001 ; Tsongalis GJ et coll., 2005**), ces tests détecteraient plus de populations virales mixtes que les techniques de séquençage, indiquant une meilleure sensibilité (**Tsongalis GJ et coll., 2005**). Par ailleurs, ils ne sont pas aussi informatifs que la technique de référence, dans un processus dynamique où le nombre de mutations associées à la résistance est soumis à une croissance rapide.

##### *Techniques de détection de mutations ponctuelles par des PCR spécifiques d'allèles*

Elles ont vu le jour avec l'avènement de la PCR en temps réel. Il s'agit de techniques attrayantes, très sensibles, permettant de détecter des variants minoritaires avec une sensibilité de plus de 0.01% (**Metzner KJ et coll., 2005 ; Johnson JA et coll., 2007**).

Ces techniques présentent néanmoins, une faiblesse. En effet chaque mutation nécessite le design d'une sonde individuelle, ce qui limite leurs utilisation en pratique courante vu le nombre conséquent de mutations possibles et leur dynamique. De ce fait leur utilisation en routine est limitée à la détection de quelques mutations bien déterminées (**Johnson JA et coll., 2008 ; Hauser A et coll., 2009**). Par ailleurs, les mutations au niveau de la fixation des sondes qui pourraient sous ou surestimer les populations de mutations limitent les performances de ces tests (**Hauser A et coll., 2009**).

### Single Genom Amplification (SGA)

Son principe appliqué au VIH consiste à réaliser une PCR à travers plusieurs séries de dilution pour isoler et amplifier l'ADNc viral issu d'un seul clone viral. L'un des avantages du SGA est de limiter le risque de recombinaison génétique *in vitro* puisque l'ADNc issu d'un seul clone sert de matrice pour chacune des PCR (**Conf. Chapitre III.3.1.2**). Il s'agit d'une technique de détection de variants minoritaires.

## **IV.3.2 Tests phénotypiques**

Les tests phénotypiques permettent de définir la concentration de l'antirétroviral inhibant 50% et 90% de la réplication virale *in vitro* : on parle de concentrations inhibitrices à 50% et 90% (CI50 et CI90) exprimées en  $\mu\text{M}$ , ou nM. (**Damond F et Decamps D, 1998 ; Bigaillon C et coll., 2010**). La résistance d'un antirétroviral 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 sensibilité d'une souche virale va se traduire par une augmentation des CI50 et CI90. Deux types de tests phénotypiques existent : les tests phénotypiques classiques et les tests utilisant des virus recombinants pour recombinant virus assay (RVA) (**Damond F et Decamps D, 1998**).

### **IV.3.2.1 Tests phénotypiques classiques**

Pour ces tests, l'isolement du virus du patient (généralement à partir des lymphocytes du sang périphérique), constitue un préalable. L'isolat est par la suite cultivé à différentes dilutions en présence d'une gamme de concentrations croissantes de l'antirétroviral à tester sur des lymphocytes d'un donneur séronégatif au VIH.

Au bout de 5 à 10 jours, l'inhibition de la réplication virale est évaluée à travers la diminution de la production d'antigène viral p24 ou de l'activité transcriptase inverse, dans le surnageant des différentes cultures (**Damond F et Decamps D, 1998**).

Les tests phénotypiques classiques nécessitant 3 à 4 semaines, sont longs à réaliser et onéreux. Ces limites ont conduit à la conception de nouveaux tests phénotypiques utilisant des virus recombinants. Leur applicabilité aux sous-types non-B a été démontré (**Bronze M et coll., 2012**) avec une bonne concordance dans l'interprétation de la pharmacorésistance en comparaison avec la base de données de Stanford (**Jiamsakul A et coll., 2012**).

#### IV.3.2.2 Tests recombinants

Comme pour les tests génotypiques, on procède à une rétrotranscription de l'ARN viral à partir du plasma. L'ADNc de la zone d'intérêt comme par exemple le fragment du gène *pol* codant pour la protéase et la transcriptase inverse est amplifié et inséré dans un virus non infectieux dont la région codante correspondante a été déletée. La co-transfection dans les cellules réceptrices conduit à une recombinaison homologue, aboutissant à un virus infectieux dont la transcriptase inverse et/ou la protéase proviennent du virus du patient. Les mesures des CI50 et CI90 s'effectuent alors en cultivant le virus recombinant en présence de plusieurs concentrations d'antirétroviraux sur des systèmes de cultures cellulaires divers. Ce concept raccourcit d'environ une semaine la durée du test qui reste cependant toujours longue (**Damond F et Decamps D, 1998 ; Wagner TA et Frenkel LM, 2006**).

Trois tests phénotypiques commerciaux sont disponibles : Antivirogram® (Virco, Mechelem, PhenoSense® (Monogram, Biosciences) et Phenoscript® (Viralliance) (**Bigaillon C et coll., 2010**). L'interprétation des résultats proposée par la firme Virco consiste en la comparaison des séquences génotypiques avec celles des patients dont le phénotype est connu et enregistré dans une base de données. Le résultat est rendu comme une estimation du phénotype théorique et pose les mêmes problèmes d'interprétation que le phénotype réel, en particulier pour les INTI (**Bigaillon et coll., 2010**).

Classiquement, la concentration inhibitrice à 50% est déterminée pour un panel d'ARV. Les résultats sont exprimés par le rapport de la CI50 de la souche du patient sur une valeur seuil définie avec un isolat considéré comme sensible à une molécule donnée. La détermination de ces valeurs seuils a d'abord été définie par rapport à la variabilité de la technique qui diffère selon les molécules. Par la suite, les firmes ont modifié ces valeurs seuils dites «techniques» en valeurs seuils «biologiques», dérivées de la distribution des CI50 (ou CI90) d'isolats provenant de patients naïfs de traitement (**Wrin T et coll., 2001**).

Le défi commun aux tests d'étude de la résistance, est de pouvoir prédire la réponse virologique d'un patient à une drogue donnée. Ainsi, les valeurs seuils définies «cliniquement» qui permettent d'apprécier l'action d'une drogue sur la suppression de la réPLICATION virale sont les plus pertinentes. Elles sont établies à partir de l'analyse d'essais cliniques visant la définition de la valeur seuil, au-delà de laquelle la réponse virologique du patient est significativement réduite ([www.monogrambio.com](http://www.monogrambio.com)). Cependant, ces valeurs n'ont pas été établies pour tous les ARV et sont inapplicables aux nouvelles molécules ou aux génotypes rares (**Bigaillon et coll., 2010**). Les tests phénotypiques sont complexes, de longue durée et n'évaluent qu'un antiviral à la fois.

#### **IV.3.3 Capacité de réPLICATION**

Une variante des tests phénotypiques, "la capacité de réPLICATION" mesure le taux de réPLICATION virale *in vitro* en l'absence d'antirétroviraux. Ce test repose sur le principe que la capacité de réPLICATION du virus d'un patient traité aux ARV, présentant des mutations de résistance est plus faible que celle d'un virus de patient naïf de tout traitement (**Martinez-Picado J et coll., 2005**). Le seul test commercial de mesure de « la capacité de réPLICATION » actuellement disponible est le test Phenosense HIV (Monogram, Biosciences, Inc).<sup>51</sup>

#### **IV.3.4 Phénotype virtuel**

Le phénotype «virtuel» consistant à l'interprétation du génotype, est une approche qui associe les méthodes génotypiques et phénotypiques. Il s'agit d'une méthode développée par la firme Virco. Elle repose sur l'utilisation d'une base de données informatique comprenant des génotypes et des phénotypes réels appariés. Après séquençage, la séquence nucléotidique obtenue est soumise à un système informatique. Ce dernier identifie toutes les mutations qui ont un impact sur la résistance à chacun des médicaments. Il recherche ensuite, parmi les séquences de patients stockées dans la base de données informatique, toutes celles qui présentent la même combinaison de mutations d'acides aminés que celle trouvée chez le patient. Après cela, le système recherche le phénotype réel correspondant à ces séquences stockées, puis calcule la CI50 moyenne pour chaque médicament antirétroviral. Dans le phénotype virtuel résultant, la résistance est exprimée sous la forme d'un rapport entre cette CI50 moyenne et la CI50 moyenne de virus naturels "wild-type". Les résultats du phénotype virtuel sont rendus comme une estimation calculée d'un phénotype théorique.

Cette interprétation, proposée par la firme Virco, inapplicable aux nouvelles molécules, pose les mêmes problèmes d'interprétation que le phénotype réel, en particulier pour les INTI. D'autre part, devant un profil génotypique rare la fiabilité de la méthode peut être mise en doute, vu le nombre faible de phénotypes correspondants analysables dans la base de données. Cette méthode qui ne présente aucun avantage supplémentaire en comparaison à un rapport génotypique seul, n'est pas recommandée en pratique clinique (**Gallego O et coll., 2004 ; Hales G et coll., 2006**).

#### **IV.3.5 Tests de tropisme**

La détermination du tropisme viral CCR5 ou CXCR4 est un préalable impératif avant la mise sous inhibiteurs de CCR5. Pour déterminer le tropisme, des tests phénotypiques utilisant des virus recombinants sont utilisés (Phenoscript® (VIRalliance Eurofins), TrofileTM (Monogram Biosciences)).

---

<sup>51</sup> <http://www.monogrambio.com/200HIVProducts.aspx> (Consulté le 23/01/2013).

Ces tests ont les mêmes limites que les tests phénotypiques de détection de la résistance : ils nécessitent une charge virale d'au moins 1000 copies/ml et ils ne permettent pas de différencier les souches ayant un double tropisme R5/X4 d'un mélange de deux populations distinctes. Leur coût et la durée de réalisation 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 de différencier les virus X4 de virus mixtes (**Bigaillon C et coll., 2010**).

#### **IV.3.6 Détermination du quotient d'inhibition génotypique (QIG)**

Le concept de QIG a débuté avec la classe des IP car leur concentration plasmatique peut être modulée et leur barrière génétique est élevée. 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 ne le sont séparément les paramètres qui servent à le calculer (**Marcelin AG et coll., 2003**). Du fait d'un manque de standardisation, la méthode n'est pas utilisée en pratique courante (**Bigaillon C et coll., 2010**).

Les tests phénotypiques ne sont pas utilisés en routine mais leur intérêt réside dans l'évaluation de nouvelles molécules et leur utilisation chez les patients multi-traités. Ils sont particulièrement utilisés pour caractériser des mutations de résistance et mesurer leur impact sur la sensibilité du VIH aux molécules antirétrovirales. C'est ainsi qu'on a pu démontrer par analyse phénotypique que les mutations N348I, T369V et A371V situées au niveau de la région C-terminale de la TI du VIH-1 sous type B, retrouvées seules, conféraient une résistance à la Névirapine et associées aux TAMS de type I et/ou de type II, entraînaient une diminution de la sensibilité à la Zidovudine (**Lengruber et coll., 2011**).

## **DEUXIEME PARTIE :**

### **Travaux de thèse**

## **DEUXIEME PARTIE : Travaux de thèse**

Nos travaux s'inscrivent dans un cadre de collaboration Sud-Sud entre les deux Laboratoires de référence nationale en VIH/SIDA, le Laboratoire de Virologie de l'Institut National de Recherches en Santé Publique (Mauritanie) et le Laboratoire de Bactériologie/Virologie Aristide le Dantec de Dakar (Sénégal).

### **I. Contexte**

#### **I.1 Généralités sur le pays**

La Mauritanie est située entre les 15ème et 27ème degrés de latitude nord et les 5ème et 17ème degrés de longitude ouest. Le pays bénéficie d'une position géographique stratégique au carrefour de l'Afrique du Nord et de l'Afrique subsaharienne. D'une superficie de 1. 030.700 km<sup>2</sup>, il est limité au Nord par le Sahara Occidental et l'Algérie, à l'Est et Sud-Est par le Mali et au Sud-Ouest par le Sénégal. Largement ouvert sur l'océan atlantique à l'ouest sur près de 700 km de côte, il est doté d'un potentiel halieutique parmi les plus riches au monde.

L'unique cours d'eau permanent du pays est le fleuve Sénégal. D'une largeur de 1 à 2,5 km, il constitue une frontière naturelle avec le Sénégal. Le pays est désertique à 80% et les terres arables ne dépassent guère 0.2% de sa superficie totale. Les sécheresses récurrentes enregistrées depuis le début des années 1970 ont entraîné dans leur sillage, un exode rural massif, une urbanisation fulgurante et une sédentarisation accélérée de la population nomade. Suite à cet exode, la population urbaine qui était d'environ 5% en 1960 est passée actuellement à 70% et Nouakchott la capitale, abrite plus du tiers de la population nationale.

Au plan administratif, le pays est subdivisé en 13 Wilayas (régions), Nouakchott la capitale y compris. Ces régions sont réparties à leur tour en 53 Moughataas (départements), elles mêmes réparties en 216 Belediyas (ou communes).<sup>52</sup>

La population mauritanienne est estimée à 3. 359.185 habitants (Juillet 2011) avec une densité de 2.4 habitants au km<sup>2</sup>. Il s'agit d'une population jeune : 40.4% de la population nationale à moins de 15 ans. Son taux d'accroissement démographique annuel est de 2.32% (2011).

---

<sup>52</sup> [http://www.ons.mr/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=6&Itemid=6](http://www.ons.mr/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=6&Itemid=6) (Consulté le 24/09/2013).

## **Principaux indicateurs démographiques (2011) :**

- indice synthétique de fécondité : 4.22 naissances/femme.
- taux brut de natalité : 32.78 naissances/1.000 habitants.
- taux brut de mortalité : 8.66 décès/1.000 habitants.
- Taux de mortalité infantile : 58.93 décès/1.000 naissances normales.
- espérance de vie à la naissance : 61.53 ans.<sup>53</sup>

## **I.2 Système de santé et organisation des services sanitaires**

Le système de santé est calqué sur le découpage administratif. De type pyramidal, il comprend trois niveaux administratifs et techniques<sup>54</sup> :

### *Sur le plan administratif :*

- Niveau central : regroupe le cabinet du Ministre, le secrétariat général, l'Inspection de la Santé, 8 directions centrales, les services et les programmes prioritaires de santé.
- Niveau intermédiaire : sert d'appui technique. Il regroupe les Directions Régionales de la Protection Sanitaire (DRPS) englobant les services régionaux préventifs et sociaux.
- Niveau périphérique ou départemental (Moughataa) constitué par les districts sanitaires.

### *Sur le plan technique (3 niveaux de prestations) :*

- Central : englobe les établissements et hôpitaux de références.
- Intermédiaire : comprend les 10 hôpitaux régionaux offrant des prestations de soins obstétricaux et néonataux.
- Périphérique : comprend les 53 CS de Moughataa (CSM) dirigés par un médecin (13 de type A 40 de type B) et 340 postes de Santé (PS) tenus par un(e) infirmier (e) et une accoucheuse. Ces structures se situent dans les grandes communes rurales et collectivités difficiles d'accès.

Le secteur privé contribue de manière significative dans la couverture sanitaire. Il compte 12 cliniques médicales, 22 cabinets médicaux de consultation externe, 15 cabinets de soins, 14 cabinets dentaires et quelques laboratoires d'analyses médicales.

<sup>53</sup> [http://www.indexmundi.com/fr/mauritanie/population\\_profil.html](http://www.indexmundi.com/fr/mauritanie/population_profil.html) (Consulté le 24/09/2013).

<sup>54</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report[1].pdf) (Consulté le 24/09/2012).



**Figure 1 : Carte géographique de la Mauritanie.<sup>55</sup>**

### I.3 Situation épidémiologique du VIH/SIDA

Selon l'ONUSIDA en 2011, l'épidémie du VIH/SIDA en Mauritanie est de type concentré avec une prévalence estimée au niveau de la population générale à 0.4% [0.3% - 0.6%]<sup>56</sup>. En effet comme le montre, les enquêtes de surveillance sentinelle et enquêtes seconde génération chez plusieurs groupes spécifiques, la séroprévalence du VIH chez les femmes enceintes est inférieure à 1% alors que des prévalences, supérieures à 5%, sont observées chez les groupes plus vulnérables au VIH, notamment les Professionnelles du Sexe (PS).

Dans le pays, les deux principaux groupes fournissant des données régulières sur l'épidémie sont respectivement : les femmes enceintes en consultation prénatale à travers les centres de santé et les donneurs de sang. Par ailleurs les données restent ponctuelles et rares.

Les données du VIH chez le groupe de donneurs étaient jusqu'en 2001, la seule source permettant de suivre la tendance de l'infection. La prévalence au sein du groupe était respectivement de 0.4%, 0.88% et 0.25% respectivement en 1989, 2002 et 2011.

<sup>55</sup> <http://www.statistiques-mondiales.com/mauritanie.htm> (Consulté le 14/12/2013).

<sup>56</sup> <http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/mauritania/> (Consulté le 09/12/2013).

La surveillance sentinelle instaurée en 2001 repose sur le groupe de femmes enceintes en consultation prénatale. Les données générées permettent de suivre l'évolution de la prévalence au sein du groupe et contribuent à l'estimation de la prévalence au sein de la population générale. Avec une évolution stable, la prévalence chez le groupe est passée de 0.57% en 2001 à 0.48% en 2009.

L'évolution de la séroprévalence chez les tuberculeux est significative ; elle était de 0.53% en 1986, 1.4% en 1996 et 4.6% en 2008.

Pour ce qui est des groupes vulnérables, les données disponibles sont relatives à une série d'enquêtes socio-comportementale et sérologique menée en 2008. Des prévalences proches de celle estimée au niveau national étaient retrouvées chez les marins (0.82%), les pêcheurs (0.83%) et les camionneurs (0.9%). Chez les prisonniers et les Professionnelles du Sexe, ces prévalences étaient respectivement de 3.9% et 7.4%. Cependant quel que soit la prévalence retrouvée, chez tous les groupes étudiés, des comportements, attitudes et pratiques à haute vulnérabilité au VIH avaient été trouvés.

## **II. Cadre de l'étude et justificatifs**

### **II.1 Cadre de l'étude**

Nos travaux ont eu pour cadre, le Centre de traitement ambulatoire (CTA) du Centre Hospitalier National (CHN) de Nouakchott, le laboratoire de Bactériologie-Virologie (LBV) du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Aristide Le Dantec (Dakar, Sénégal) et l'Institut National de Recherches en Santé Publique (INRSP) de Nouakchott (Mauritanie).

#### **II.1.1 Centre de traitement ambulatoire (CTA) du Centre Hospitalier National (CHN) de Nouakchott**

Le CTA est la structure publique de référence pour la prise en charge et le suivi des Personnes Vivant avec le VIH (PVVIH), abritée par le Centre Hospitalier National de Nouakchott (CHN). Il assure la prise en charge médicale (traitement ARV et maladies opportunistes) et quelques aspects de la prise en charge sociale et nutritionnelle des PVV- VIH. Il est doté d'un laboratoire assurant qui assure le suivi immunologique et les examens complémentaires en hématologie et biochimie.

## **II.1.2 Institut National de Recherches en Santé Publique (Mauritanie)**

L'INRSP est un établissement public de référence sous tutelle du Ministère de la Santé en charge de la recherche en santé publique. Il regroupe les laboratoires de référence dans plusieurs domaines :

- paludisme et parasitoses intestinales,
- mycobactéries, essentiellement la tuberculose,
- viroses : fièvres hémorragiques, grippes...

Dans le cadre particulier du VIH/SIDA il abrite le laboratoire de Virologie : laboratoire de référence nationale en charge du suivi virologique des patients sous traitement antirétroviral, de la surveillance épidémiologique, la recherche opérationnelle et la formation des personnels de laboratoire des structures de santé périphériques en diagnostic du VIH.

Le laboratoire est constitué de 4 unités dont l'Unité de Biologie moléculaire qui assure le test de charge virale pour patients de la cohorte nationale de santé publique suivie au Centre de Traitement Ambulatoire du CHN.

## **II.1.3 Laboratoire de Bactériologie-Virologie Aristide Le Dantec de Dakar (Sénégal)**

Il s'agit du laboratoire de référence nationale des IST et du VIH/SIDA, sous la responsabilité du Professeur Souleymane Mboup. Dès 1985, le laboratoire a initié en partenariat avec le programme national de lutte contre les IST/SIDA, des programmes de recherche sur les rétrovirus humains en collaboration avec des équipes européennes, américaines et africaines. Ce partenariat qui a débuté avec la convention de recherche inter-universitaire sur les rétrovirus qui liait les universités de Dakar, Tours, Limoges et Harvard a permis en 1986 la première description puis la caractérisation du VIH-2.

Le laboratoire constitue un centre de formation pour la région Afrique de l'Ouest. Il abrite le Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS) et assure la formation des biologistes francophones dans le cadre d'un Diplôme Universitaire de Rétrovirologie. A côté d'autres unités, le laboratoire a une Unité de Biologie moléculaire. Cette dernière a en charge, le diagnostic précoce et suivi virologique des PVVIH en partenariat avec les structures nationales de santé publique. L'unité assure par ailleurs des activités de recherche notamment dans le domaine de la résistance aux ARV et la diversité génétique du VIH.

## **II.2 Justificatifs**

En Mauritanie, le premier cas de VIH a été officiellement notifié en 1987. De cette période à 2001, l'épidémie était très peu documentée et le pays ne disposait pas d'un système de surveillance continue de l'épidémie. Suite à l'enquête nationale sérologique chez les femmes en consultation pré-natale, un système structuré de surveillance sentinel a été mis en place. Depuis 2001, les enquêtes ont été menées tous les deux ans chez les femmes en consultation pré-natale fréquentant les centres de santé des capitales de wilayas (régions). Jusqu'en 2007, l'évolution et la tendance de l'infection au sein du groupe sentinel n'étaient pas connues et aucune évaluation de la qualité des activités des sites n'avait été effectuée. Il s'avérait alors nécessaire d'une part, de connaître l'évolution de l'infection au sein du groupe, et d'autre part de faire un bilan sur la qualité des données générées pour en tirer les recommandations nécessaires.

L'objectif de notre premier travail de thèse était d'étudier l'évolution de la prévalence du VIH et d'évaluer la qualité des données générées dans le cadre du réseau national de surveillance sentinel chez les femmes enceintes en consultation pré-natale sur la période de 2001 à 2007.

Après plusieurs années de surveillance sérologique, le constat était que cette dernière à elle seule ne suffisait pas pour bien cerner l'épidémie du VIH/SIDA dans le pays, d'où l'intérêt de s'orienter vers la surveillance de seconde génération (biologique et comportementale), plus en mesure de définir les facteurs et comportements qui propagent l'infection. Les enquêtes de surveillance de seconde génération ont été amorcées dans le pays en 2008 avec le ciblage de quelques groupes supposés vulnérables au VIH tels que, les marins, les pêcheurs, les camionneurs, les Professionnelles du Sexe, (PS) et les prisonniers.

Chez les consultants pour IST (Infections Sexuellement Transmissibles, la seule étude officielle remontait à plus d'une décennie (**Lo B et coll., 1997**).

Les IST (ulcérantes et non ulcérantes) augmentent le risque de transmission du VIH (**Wilkinson D et Rutherford G, 2001**). Vu ce lien et afin de disposer de données biologique et comportementale récentes chez le groupe, il était important de se faire une idée sur la prévalence du VIH et de définir les comportements, attitudes et pratiques qui lui sont sous-jacents, d'où :

notre deuxième objectif de travail de thèse, était d'estimer en marge des enquêtes de seconde génération menées dans le pays à la même période, la prévalence du VIH chez les consultants pour IST et de décrire leurs Connaissances, Comportements, Attitudes et Pratiques (CCAP) face au VIH.

L'avènement des antirétroviraux a été associé à un succès clinico-virologique et à une amélioration de la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH. Cependant, ce succès est compromis par la survenue de la résistance. En Mauritanie, la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) a démarré en 2005 et la charge virale introduite en 2009. Le test génotypique de résistance n'est pas encore disponible et la situation de la résistance et l'épidémiologie moléculaire du VIH dans le pays sont encore méconnues. Compléter les données de surveillance épidémiologique avec des données sur la résistance aux ARV et l'épidémiologie moléculaire des souches de VIH qui circulent dans le pays donnerait une situation plus complète de l'infection. L'association de ces 2 types de données permettra d'orienter les stratégies de prévention et de guider le choix de traitement de 2ème ligne chez les patients en échec virologique.

Notre 3ème objectif a concerné la documentation du profil de résistance et l'épidémiologie moléculaire des souches de VIH-1 circulantes en Mauritanie.

La grande variabilité génétique du VIH peut avoir un impact sur la performance des techniques de quantification virale. Ces techniques optimisées à partir du sous type B sont utilisées dans les pays du Sud où prédominent les sous-types non B. Evaluer leurs performances à quantifier les souches qui circulent dans ces pays s'avère nécessaire. C'est ainsi que :

pour le quatrième objectif, nous avons évalué les technologies de charge virale utilisées dans notre contexte.

Tous ces objectifs ont fait l'objet d'études et d'articles scientifiques.

### **III. Analyses des travaux**



## **Surveillance sentinelle du VIH chez les femmes en consultation prénatale**



### **III.1 Article n° 1 : Surveillance sentinelles du VIH chez les femmes enceintes en Mauritanie entre 2001 et 2007.**

Bull. Soc. Pathol. Exot. (2010) 103:243-245  
DOI 10.1007/s13149-010-0042-3

SANTÉ PUBLIQUE / PUBLIC HEALTH

### **Surveillance sentinelles du VIH chez les femmes enceintes en Mauritanie entre 2001 et 2007**

**HIV sentinel surveillance of pregnant women in Mauritania from 2001 to 2007**

**F.Z. Fall-Malick · A.O. Bara · M. Lam · M. Mint Beibacar · K. Ba · H. Ba · I. Ould Ghady · A. Ould Horma · N.C. Toure-Kane · S. Mboup · B. Lo**

#### **III.1.1 Problématique**

En Mauritanie, le premier cas de SIDA a été notifié officiellement en 1987. Jusqu'en 2001, l'épidémie du VIH/SIDA était très peu documentée et les seules données régulières permettant de suivre l'évolution de l'infection étaient celles des donneurs de sang.<sup>57</sup> Ceci a poussé à la réalisation de la première enquête d'envergure chez les femmes en consultation pré-natale couvrant les 13 wilayas (régions) du pays et à la mise en place d'une surveillance sentinelle menée avec une périodicité biennale. L'intérêt de la surveillance chez les femmes enceintes est justifié par l'accès facile à la cible, la minimisation des coûts de la surveillance (test fait dans le cadre des activités du bilan de grossesse). Par ailleurs, cette surveillance permet de manière indirecte de se faire une idée sur les infections récentes chez les femmes enceintes (à travers les femmes âgées de moins de 25 ans) et donc sur l'incidence du VIH au sein du même groupe. Ainsi, il est possible d'examiner la tendance de la séroprévalence des femmes récemment infectées mais également celle de la prévalence par site qui est utilisée pour orienter les stratégies de prévention et de prise en charge. La surveillance sentinelle en Mauritanie est menée chez le même groupe de femmes enceintes en consultation pré-natale (CPN) selon les recommandations de l'OMS<sup>58</sup>.

Après plusieurs années, il était nécessaire d'évaluer la qualité des données générées et de se faire une idée sur l'évolution de l'épidémie au niveau des sites de surveillance.

<sup>57</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) (Consulté le 05/09/2013).

<sup>58</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 12/09/2013).

### **III.1.2 Objectif**

L'objectif de ce travail était de faire le point sur les données de la surveillance sentinelle entre 2001 et 2007 en Mauritanie. Les objectifs spécifiques visés étaient :

- apprécier l'évolution de la prévalence des sites entre 2001 et 2007.
- apprécier la qualité des données générées.

### **III.1.3 Méthodologie**

Il s'agit d'une enquête de périodicité biennale, de type transversale, descriptive et analytique anonyme non corrélé. Elle a ciblé les femmes enceintes en consultation prénatale (CPN) dans les centres de santé. La taille de l'échantillon pour 2001 et 2003 était de 300 par site. A partir de 2005, l'échantillon requis a été fixé à 600. Toute femme se présentant à son 1er rendez-vous de CPN a été incluse et avait fait l'objet d'un questionnaire et d'un prélèvement de sang veineux de 5 ml sur tube sec. L'analyse des sérum a été faite selon un algorithme utilisant deux tests ELISA 3ème génération : Genscreen (Biorad) et Murex (Abott) et un test de confirmation : New Lav Blot I et II (Biorad). La période de collecte des échantillons était de 3 à 4 mois selon les sites par année d'étude. Le contrôle de la qualité a concerné 10% des échantillons négatifs sélectionnés au hasard et l'ensemble des échantillons positifs. Les données recueillies étaient strictement anonymes et non corrélées à l'identité des individus sélectionnés. La saisie et analyse des données ont été faites par les logiciels Excel, Epi-info version 6.4D et SPSS version 10.0. Après l'étude descriptive des prévalences et un calcul des tendances, le test de Khi 2 et l'intervalle de confiance (I.C) à 95% ont été appliqués pour établir des comparaisons.

### **III.1.4 Résultats**

Le nombre de sites était de 8 et 17 selon l'année. Les tailles des échantillons étaient de 4204 femmes en 2001, 2393 en 2003, 5126 en 2005 et 5070 en 2007.

La prévalence du VIH chez les femmes en milieu rural n'était pas disponible. Celle des jeunes femmes de 15-24 ans était disponible pour l'année 2005 et montrait une différence statistiquement significative pour le site de Sebkha à Nouakchott ( $p = 0.04 < 0.05$ ) avec une prévalence de 2.2% chez les 15 -24 ans versus 1.2% pour les femmes de 25 ans et plus.

**Tableau VII : Prévalence du VIH chez les femmes en CPN au niveau des sites sentinelles entre 2001 et 2007.**

SITE	ANNEE								
	2002		2003		2005		2007		
	n	Prév. (%)							
Néma	299	3 ( <b>1.00</b> ) 0-1.6	-	-	533	4 ( <b>0.75</b> ) 0-1.55	139	0	<b>0.990&gt;0,05</b>
Aïoun	-	-	-	-	-	-	331	0	
Kiffa	391	3 ( <b>0.77</b> ) 0-1.64	308	3 ( <b>0.97</b> ) 0-2.06	801	1 ( <b>0.12</b> ) 0-0.36	605	6 ( <b>0.99</b> ) 0.20-1.78	<b>0.149&gt;0,05</b>
Sélibaby	297	2 ( <b>0.67</b> ) 0-1.60	300	4 ( <b>1.33</b> ) 0.03-2.63	-	-	425	2 ( <b>0.47</b> ) 0-1.12	<b>0.416&gt;0,05</b>
Kaédi	283	1 ( <b>0.35</b> ) 0-1.04	-	-	611	7 ( <b>1.15</b> ) 0.30-2.00	641	2 ( <b>0.31</b> ) 0-0.74	<b>0.146&gt;0,05</b>
Aleg	-	<b>0</b>	307	1 ( <b>0.32</b> ) 0-0.95	-	-	-	-	
Rosso	296	3 ( <b>1.01</b> ) 0-2.15	295	3 ( <b>1.01</b> ) 0-2.17	607	2 ( <b>0.33</b> ) 0.46-2.14	390	2 ( <b>0.51</b> ) 0-1.22	<b>0.500&gt;0,05</b>
Akjoujt	-	-	118	<b>0</b>	-	-	-	-	
Atar	-	-	-	-	-	-	198	<b>0</b>	
Tidjikja	282	<b>0</b>	-	-	-	-	-	-	
Zouérate	271	1 ( <b>0.37</b> ) 0-1.09	-	-	-	-	445	2 ( <b>0.45</b> ) 0.17-1.07	<b>0.663&gt;0,05</b>
Nouadhibou	590	6 ( <b>1.01</b> ) 0.2-1.82	452	4 ( <b>0.88</b> ) 0.02-1.74	694	9 ( <b>1.3</b> ) 0.46-2.14	606	9 ( <b>1.48</b> ) 0.52-2.44	<b>0.796&gt;0,05</b>
Toujournine	300	<b>0</b>	-	-	-	-	-	-	
Arafat ext.	297	<b>0</b>	-	-	-	-	-	-	
Sebkha	299	1 ( <b>0.33</b> ) 0.32-0.98	300	2 ( <b>0.66</b> ) 0-1.58	765	8 ( <b>1.05</b> ) 0.33-1.77	650	7 ( <b>1.07</b> ) 0.28-1.86	<b>0.642&gt;0,05</b>
Poly-clinique	299	1 ( <b>0.33</b> ) 0.32-0.98	313	3 ( <b>0.95</b> ) 0-2.02	593	7 ( <b>1.18</b> ) 0.31-2.05	-	-	<b>0.453&gt;0,05</b>
Teyarett	300	3 ( <b>1.00</b> ) 0.13-2.13	-	-	522	3 ( <b>0.57</b> ) 0.08-1.22	640	1 ( <b>0.15</b> ) 0.15-0.45	<b>0.201&gt;0,05</b>
<b>TOTAL</b>	<b>4204</b>	24 ( <b>0.57</b> ) 0.34-0.80	<b>2393</b>	20 ( <b>0.83</b> ) 0.44-1.16	<b>5126</b>	40 ( <b>0.80</b> ) 0.56-1.04	<b>5070</b>	31 ( <b>0.61</b> ) 0.40-0.82	<b>0.396&gt;0,05</b>

## Surveillance sentinelle du VIH chez les femmes enceintes en Mauritanie entre 2001 et 2007

### HIV sentinel surveillance of pregnant women in Mauritania from 2001 to 2007

F.Z. Fall-Malick · A.O. Bara · M. Lam · M. Mint Beibacar · K. Ba · H. Ba · I. Ould Ghady · A. Ould Horma · N.C. Toure-Kane · S. Mboup · B. Lo

Courte note reçu le 20 août 2009 ; acceptée le 2 décembre 2009  
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

**Résumé** Selon le rapport 2008 sur l'épidémie de sida dans le monde, 33 millions de personnes vivent avec le VIH/sida. L'Afrique intertropicale est la région du globe la plus touchée. Le premier cas de sida en Mauritanie a été décrit en 1987. La prévalence nationale du VIH/sida dans le pays est estimée à moins de 1 %. La surveillance sérologique du VIH chez les femmes enceintes mauritanaises a été mise en place en 2001. Notre travail s'est concentré sur la surveillance sentinelle du VIH chez les femmes enceintes dans les cliniques anténatales, les centres de santé dans les différentes wilayas (régions) du pays, afin de suivre l'évolution de la prévalence entre 2001 et 2007. Une méthode anonyme et non corrélée est utilisée dans cette enquête. Un questionnaire a été appliqué et des prélèvements veineux ont été effectués chez les femmes éligibles. Les analyses ont été conduites avec un algorithme basé sur deux tests de dépistage (Elisa) et un autre test pour confirmation (New Lav Blot). Malgré certaines disparités entre les sites étudiés, les résultats ont révélé un faible taux de prévalence (entre 0,1 et 1,48). La prévalence moyenne des échantillons recueillis infectés par le VIH est passée de 0,57 % [0,34–0,80] en 2001 à 0,61 % [0,40–0,82] en 2007, avec un intervalle de confiance à

95 %. L'analyse statistique n'a révélé aucun changement significatif entre 2001 et 2007, dans tous ces sites. Le VIH1 est le type le plus fréquent, avec une proportion de 93,5 % en 2007. Après plusieurs années de surveillance sentinelle classique du VIH, et pour mieux comprendre les disparités entre les sites, nous préconisons une surveillance sentinelle de seconde génération (comportementale et sérologique).

**Mots clés** infection à VIH · séroprévalence  
centres de santé · surveillance sentinelle  
évolution · Mauritanie · Afrique

**Abstract** According to the 2008 report on global AIDS epidemic, 33 millions of people are living with HIV/AIDS. Subsaharan Africa is the most affected part of the world. The first case of AIDS in Mauritania was reported in 1987. The national prevalence of HIV/AIDS in the country is estimated at less than 1%. The HIV serosurveillance among pregnant women started in country in 2001. This work has focused on HIV sentinel surveillance among pregnant women in antenatal clinics, attending health centres in different wilayas (regions) of the country in order to assess evolution of prevalence between 2001 and 2007. An anonymous and non-correlated method is used for this survey. A questionnaire was administered and venous sampling made for eligible women. Analyses were performed with an algorithm based on two screening tests (ELISA) and another test for confirmation (New Lav Blot). Despite some disparities between the sites considered, the results have shown a low prevalence rate (between 0.1 and 1.48). The average prevalence of HIV infection samples collected increased from 0.57% [0.34–0.80] in 2001 to 0.61% [0.40–0.82] in 2007 with 95% confidence interval. Statistical analysis showed no significant changes between 2001 and 2007 at all these sites. HIV1 is the most frequent type with a proportion of 93.5% in 2007. After several

F.Z. Fall-Malick (✉) · A.O. Bara · M. Lam · M. Mint Beibacar · K. Ba · H. Ba · I. Ould Ghady · B. Lo  
Laboratoire de virologie, institut national de recherches en santé publique, BP 695 Nouakchott,  
Mauritanie  
e-mail : fzfall@yahoo.fr

A. Ould Horma  
Secrétariat exécutif national de lutte contre le sida,  
BP 5161 Nouakchott, Mauritanie

N.C. Toure-Kane · S. Mboup  
Laboratoire de bactériologie virologie,  
CHU Aristide-Le-Dantec,  
30, rue Pasteur, BP 7325 Dakar, Sénégal

years of classic HIV sentinel surveillance, and to better understand disparities between sites, we recommend a second generation sentinel surveillance (behavioural and serological) approach.

**Keywords** HIV infection · seroprevalence · health centres · sentinel surveillance · trend · Mauritania · Africa

## Introduction

Selon le rapport mondial 2008 sur l'épidémie du sida [4], environ 33 millions de personnes vivent avec le VIH/sida, et l'Afrique est la région la plus touchée. En Mauritanie, le premier cas de sida a été notifié en 1987, et la prévalence du VIH/sida est estimée à moins de 1 %.

La surveillance sentinelle a débuté dans le pays en 2001 et concerne les femmes enceintes en consultation prénatale [3]. Ce travail s'est proposé de faire le point sur ces données de surveillance sentinelle entre 2001 et 2007 en Mauritanie, pour mieux en apprécier les tendances.

## Cadre de l'étude

La Mauritanie couvre une superficie de 1 030 700 km<sup>2</sup> pour une population d'environ trois millions d'habitants. Le pays partage des frontières avec l'Algérie, le Maroc, le Sénégal et le Mali. Il est subdivisé en 13 wilayas (régions), 53 moughataas (départements) et 218 communes. Les sites de surveillance sentinelle se situent au niveau des centres de santé des capitales de wilayas [3].

## Matériels et méthodes

Il s'agit d'une enquête de périodicité biennale, de type transversal, descriptif, analytique anonyme et non corrélé. Elle a ciblé les femmes enceintes en consultation prénatale (CPN) des centres de santé de wilayas (régions). L'échantillon pour 2001 et 2003 était de 300 par site. En 2005 et 2007, il est passé à 600 (Tableau 1).

Toute femme enceinte à son premier rendez-vous de CPN a été incluse et a fait l'objet d'un questionnaire et d'un prélèvement de sang veineux de 5 ml sur tube sec.

L'algorithme adopté a utilisé deux tests Elisa de troisième génération : Genscreen™ (Biorad) et Murex (Abbott), et un test de confirmation : New Lav Blot I et II (Biorad).

La période d'enquête par année était de trois à quatre mois selon les sites. Le contrôle de la qualité a concerné 10 % des échantillons négatifs sélectionnés au hasard et la totalité des échantillons positifs [3].

**Tableau 1** Prévalence du VIH chez les femmes en CPN au niveau des sites sentinelles entre 2001 et 2007/HIV prevalence among women attending prenatal consultation at the sentinel sites from 2001 to 2007

Site	2001			2003			2005			2007			<i>p</i>
	<i>n</i>	pos	Prévalence en % et [IC]	<i>n</i>	pos	Prévalence en % et [IC]	<i>n</i>	pos	Prévalence en % et [IC]	<i>n</i>	pos	Prévalence en % et [IC]	
Néma	299	3	1,00 [0–1,6]	—	—	—	533	4	0,75 [0–1,55]	139	—	—	0,99
Kiffa	391	3	0,77 [0–1,64]	308	3	0,97 [0–2,06]	801	1	0,12 [0–0,36]	605	6	0,99 [0,20–1,78]	0,15
Sélibaby	297	2	0,67 [0–1,60]	300	4	1,33 [0,03–2,63]	—	—	—	425	2	0,47 [0–1,12]	0,42
Kaédi	283	1	0,35 [0–1,04]	—	—	—	611	7	1,15 [0,30–2,00]	641	2	0,31 [0–0,74]	0,15
Rosso	296	3	1,01 [0–2,15]	295	3	1,01 [0–2,17]	607	2	0,33 [0,46–2,14]	390	2	0,51 [0–1,22]	0,50
Zouérate	271	1	0,37 [0–1,09]	—	—	—	—	—	—	445	2	0,45 [0,17–1,07]	0,66
Nouadhibou	590	6	1,01 [0,2–1,82]	452	4	0,88 [0,02–1,74]	694	9	1,3 [0,46–2,14]	606	9	1,48 [0,52–2,44]	0,80
Nouakchott (Sebkha)	299	1	0,33 [0,32–0,98]	300	2	0,66 [0–1,58]	765	8	1,05 [0,33–1,77]	650	7	1,07 [0,28–1,86]	0,64
Nouakchott (Polyclinique)	299	1	0,33 [0,32–0,98]	313	3	0,95 [0–2,02]	593	7	1,18 [0,31–2,05]	—	—	—	0,45
Nouakchott (Teyarett)	300	3	1,00 [0,13–2,13]	—	—	—	522	3	0,57 [0,08–1,22]	640	1	0,15 [0,15–0,45]	0,20
Total	4 204	24	0,57 [0,34–0,89]	2 393	20	0,83 [0,44–1,16]	5 126	40	0,80 [0,56–1,04]	5 070	31	0,61 [0,40–0,82]	0,40

Pour la saisie et l'analyse des données, les logiciels Excel et EpiInfo™ version 6.4D et SFSS version 10 ont été utilisés. Pour établir des comparaisons, le test de  $\chi^2$  et un intervalle de confiance (IC) à 95 % ont été appliqués.

## Analyse

Le nombre de sites était compris entre huit et 17 selon l'année. Les échantillons étaient de 4 204 femmes en 2001, 2 393 en 2003, 5 126 en 2005 et 5 070 en 2007.

Selon les sites, la prévalence variait entre 0,10 et 1,48 %. Sans que la différence ne soit statistiquement significative, c'était au niveau des grandes agglomérations que les prévalences les plus élevées (autour de 1 %) ont été observées. Pour un IC à 95 %, l'évolution de la séroprévalence moyenne était statistiquement non significative ( $p = 0,39$ ) ; elle était respectivement de 0,57 et 0,83 % en 2001 et 2003 et de 0,80 et 0,61 % en 2005 et 2007.

Le VIH1 prédominait au niveau des sites, avec des proportions respectivement de :

- 87 % en 2001, avec 9 % de VIH2 et 4 % de doubles séropositivités ;
- 94 % en 2007, avec 6 % de VIH2 et aucune double séropositivité.

## Discussion

La surveillance sentinelle en Mauritanie entre 2001 et 2007 montre des prévalences à évolution stable, avec des disparités régionales. Les prévalences les plus élevées ont été régulièrement observées au niveau des deux grandes agglomérations. Cette situation a été rapportée dans les études de surveillance chez les femmes enceintes au Maroc et au Sénégal. Pour des échantillons globalement comparables, compris entre 300 et 600 par site, cette moyenne de prévalence était plus élevée que celle du Maroc (autour de 0,1 %) et plus faible que celle du Sénégal (entre 0,7 et 1,4 %). Le VIH1 prédominait avec une proportion plus importante que celle retrouvée au Maroc et moins importante qu'au niveau du Sénégal [1,2].

L'analyse des données collectées a relevé des insuffisances relatives à la prévalence en milieu rural et en fonction des tranches d'âge.

## Conclusion

Notre travail a montré que la surveillance sentinelle chez les femmes enceintes en Mauritanie de 2001 et 2007 est caractérisée par une prévalence relativement faible sans évolution significative dans le temps.

Nous recommandons dans le cadre de ce travail :

- d'enrichir les données de surveillance sentinelle par l'exploitation de l'âge des femmes et l'intégration de données de prévalence en milieu rural ;
- d'accompagner la surveillance sentinelle par des enquêtes sur les comportements attitudes et pratiques (CAP) pour expliquer les disparités entre sites ;
- de mener une enquête nationale EDS+ (comportementale et biologique) pour se faire une idée globale et complète sur la situation épidémique du pays.

**Remerciements** À toutes les structures ou personnes ayant contribué aux différentes activités des enquêtes :

- les directeurs régionaux des affaires sanitaires (DRAS) ;
- les médecins chefs des sites de surveillance sentinelle et leurs équipes de laboratoire et de consultations pré-natales ;
- M. Sow Amadou Modou et M. Diaw Mamadou ;
- le personnel du laboratoire de virologie de l'INRSP ayant contribué au travail de traitements biologiques des échantillons (M. Diallo Mamadou et M. N'Diaye Mamadou).

**Conflit d'intérêt :** aucun.

## Références

1. Elharti E, Zidouh A, Mengad R, et al (2002) Monitoring HIV through sentinel surveillance in Morocco. East Mediterr Health J 8(1):141–9
2. Mboup S, Gueye-Gaye A, Ndoye PM, et al (2008) Données épidémiologiques du VIH/sida au Sénégal 2005–2006–2007. Ministère de la Santé et de la Prévention médicale, Dakar. (N°13)
3. Ministère de la Santé, Institut national de recherches en santé publique (INRSP) (2007) Rapport sur les résultats de la surveillance des sites sentinelles des femmes enceintes en 2007. Ministère de la Santé de Mauritanie, Nouakchott
4. Onusida (2008) Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2008. Onusida, Genève

### **III.1.5 Conclusion**

La surveillance sentinelle en Mauritanie entre 2001 et 2007 a montré des prévalences à évolution stable, avec des disparités régionales. Les prévalences les plus élevées ont été régulièrement observées au niveau des deux grandes agglomérations (Nouakchott et Nouadhibou). La surveillance de la séroprévalence chez les jeunes femmes de 15-24 ans, qui permet de se faire une idée indirecte de l'incidence du VIH parmi les femmes en CPN recommandée par l'OMS<sup>59</sup> n'a été effectuée que pour l'année 2005. L'analyse des données collectées a aussi montré des insuffisances relatives à la prévalence en milieu rural. Ces données permettent de suivre la prévalence au sein de la population générale, mais pour avoir une vision globale en vue d'une meilleure orientation des stratégies, il est également important de disposer de données chez les groupes vulnérables comme les consultants pour IST et cette population a été notre cible dans le deuxième objectif de cette thèse.

Après plusieurs années de surveillance par réseau sentinelle pour suivre l'épidémie au niveau du pays, s'orienter vers des enquêtes secondes générations devenait une nécessité. En effet, ces dernières sont plus adaptées pour définir les facteurs et comportements qui propagent l'infection à VIH dans les groupes étudiés. Leur réalisation est d'autant plus importante qu'elles sont en mesure de permettre une meilleure estimation de la prévalence du VIH et de définir le type d'épidémie national en l'absence d'une enquête EDS+ (Enquête Démographique et de Santé intégrant un test VIH). Dans le cadre de nos travaux nous nous sommes intéressés aux consultants pour infections sexuellement transmissibles (IST) au niveau de 3 sites : l'ONG Santé Sans Frontières (SSF) et l'Institut National de Recherches en Santé Publique (INSRP) à Nouakchott et le CHN/NDB (Centre Hospitalier National de Nouadhibou). Le choix de cette cible était basé sur le facteur favorisant des IST non traités sur l'infection par le VIH.

---

<sup>59</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 12/09/2013).



## **Surveillance seconde génération (sérologique et socio- comportementale) chez les consultants pour Infections Sexuellement Transmissibles (IST).**

## **III.2 Article N° 2 : Séroprévalence VIH chez les consultants IST à Nouakchott et Nouadhibou (Mauritanie).**

Bull. Soc. Pathol. Exot.  
DOI 10.1007/s13149-010-0098-4

ANTHROPOLOGIE MÉDICALE / MEDICAL ANTHROPOLOGY

### **Séroprévalence VIH chez les consultants IST à Nouakchott et à Nouadhibou (Mauritanie)**

HIV seroprevalence among STD patients in Nouakchott and Nouadhibou (Mauritania)

M. Kebe · F.Z. Fall-Malick · O.I. Elghady · O.H. Ebnou · O.A. Bara · M. Lam · M.O. Beibacar · M.Y. Diallo · M. Keita · I. Sy · A.J. Bellaty · C. Ly · B.B. Lô

#### **III.2.1 Probématique**

En Mauritanie, les données relatives aux Infections Sexuellement Transmissibles et à la prévalence du VIH chez le groupe restent insignifiantes et/ou peu fiables. La dernière enquête chez le groupe remontait à 1997 (**Lo B et coll., 1997**). Du fait du tabou culturel autour des Infections Sexuellement Transmissibles (IST), les porteurs d'IST préfèrent consulter des filières parallèles (Pharmacies) plutôt que les structures de santé. La surveillance sentinelle (sérologique) structurée a été instaurée en Mauritanie en 2001 chez les femmes en consultation prénatale. Les données recueillies entre 2001 et 2007 ont montré une séroprévalence relativement faible (0.62% en 2007) et une évolution stable de l'épidémie au sein du groupe.

Après plusieurs années de surveillance sérologique, pour mieux documenter l'épidémie du VIH/SIDA en Mauritanie, il était important de s'orienter vers la surveillance seconde génération plus en mesure d'expliquer les comportements sous-jacents à la prévalence observée chez un groupe étudié.<sup>60</sup> C'est dans ce cadre qu'une série d'enquêtes seconde génération chez plusieurs groupes supposés vulnérables ont été amorcées en 2008.<sup>61</sup> Nous-nous sommes intéressés dans le cadre de cette étude aux consultants pour IST au niveau de Nouakchott et Nouadhibou.

<sup>60</sup> <http://www.who.int/hiv/pub/surveilance/en/isbn9291732206fr.pdf> (14/09/2013).

<sup>61</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) (14/09/2013).

### **III.2.2 Objectif**

L'objectif de cette étude était d'estimer la séroprévalence de l'infection par le VIH et de décrire les Connaissances Comportements Attitudes et Pratiques (CCAP) des consultants pour IST face au VIH/SIDA à Nouakchott et Nouadhibou.

### **III.2.3 Méthodologie**

Il s'agit d'une enquête, anonyme et confidentielle aussi bien pour les données collectées (cliniques et comportementales) que pour le volet biologique (tests VIH et syphilis). Elle s'est déroulée sur la période de décembre 2007 à décembre 2008 au niveau de 3 sites et a porté sur les consultants IST sur la base d'un consentement éclairé obtenu auprès de chaque patient avant son inclusion. Les 3 sites d'enquête étaient situés à Nouakchott (Institut National de Recherches en Santé Publique (INRSP) ; Centre Alpha de l'ONG Santé Sans Frontières (SSF)) et Nouadhibou (Hôpital National de Nouadhibou). Le référencement des patients vers les sites avait nécessité une sensibilisation des personnels de pharmacies, centres de santé et cliniques privées offrant des consultations externes en gynécologie et dermatologie. Tout consultant présentant un écoulement urétral (Gonocoques, Chlamydiae,...) une ulcération génitale (syphilis, chancre mou...) ou tout autre symptôme d'IST (condylomes génitaux, bubon inguinal, tuméfaction du scrotum, syndrome abdominal pelvien...) et acceptant de participer à l'enquête sur la base d'un consentement écrit a été inclus et avait fait l'objet d'un examen clinique, d'une interview à travers un questionnaire et d'un prélèvement de sang. L'anonymat et la confidentialité des données ont reposé sur un système de codage avec accès limité à la base de données. Le diagnostic clinique et la prise en charge des IST étaient basés sur l'approche syndromique. Le diagnostic de l'infection à VIH a fait recours à deux tests ELISA de troisième génération (Genscreen®/Biorad, Murex®/Abott) et un test de confirmation, New Lav Blot I/II(Biorad). Le diagnostic de la syphilis a reposé sur un test RPR et un test TPHA.

### **III.2.4 Résultats**

Deux cent vingt quatre (224) consultants pour motif d'IST avec un sex-ratio de 1.01 et une moyenne d'âge de 35 ans ont été inclus dans l'étude. Parmi eux 37% avaient moins de 30 ans. Les mariés constituaient la majorité des enquêtés avec respectivement pour les monogames et polygames des proportions de 59.8% et de 9.4%. Les patients étaient relativement jeunes avec un âge maximal de 40 ans (78% ; n=164) et étaient à 70.5% (n=148) mariés et n'avaient pas dépassé pour la plupart le niveau primaire (81.4% ; n=171).

Les symptômes d'IST les plus cités par les enquêtés étaient les mictions douloureuses, les ulcérations/plaies génitales et les douleurs abdominales basses et les principaux retrouvés étaient (n= 64 ; 30.5%) les douleurs abdominales basses et les douleurs mictionnelles. Parmi les enquêtés, 94% et 83% ont entendu parler respectivement du VIH et des IST. Les enquêtés à 97 % confirmaient qu'on pouvait se protéger du VIH en ayant un partenaire sexuel fidèle non séropositif et presque 1 sur 10 d'entre-eux (9.8%) pensaient que fréquenter les petites filles ou filles vierges constituait une protection contre l'infection.

Les enquêtés avaient à 21% des partenaires sexuels occasionnels en dehors de leurs conjoints présentant eux-mêmes des IST (26.7%), et seulement 50% d'entre-eux informaient leurs partenaires sur leur IST. Bien que 80% des consultants savaient que le préservatif a pour rôle de protéger contre les IST, 75% d'entre-eux ne l'utilisaient pas lors des rapports extraconjugaux. Les principales raisons avancées pour la non utilisation du préservatif étaient qu'il réduirait le plaisir (41.7%) ou son oubli au moment du rapport sexuel (25%). Les prévalences du VIH et de la syphilis étaient respectivement de 9% et 10%.

**Tableau VIII : Statut sérologique (VIH) selon l'âge, le statut matrimonial et niveau d'instruction.**

		Statut VIH		
		Ech. (n)	Séro- positif (n)	%
<b>Selon âge</b>	<b>&lt; 20 ans</b>	35	1	2.9
	<b>21-40 ans</b>	129	15	<b>11.6</b>
	<b>≥ 40 ans</b>	46	3	6.5
<b>Selon statut matrimonial</b>	<b>Mariés (mono/poly-game)</b>	148	13	<b>8.8</b>
	<b>Célibataire</b>	62	6	9.7
<b>Selon niveau d'instruction</b>	<b>Aucun</b>	58	10	<b>17.2</b>
	<b>Ecole coranique</b>	62	3	4.8
	<b>Primaire</b>	51	3	5.9
	<b>Secondaire et plus</b>	39	3	7.7

## Séroprévalence VIH chez les consultants IST à Nouakchott et à Nouadhibou (Mauritanie)

HIV seroprevalence among STD patients in Nouakchott and Nouadhibou (Mauritania)

M. Kebe · F.Z. Fall-Malick · O.I. Elghady · O.H. Ebnou · O.A. Bara · M. Lam · M.O. Beibacar · M.Y. Diallo · M. Keita · I. Sy · A.J. Bellaty · C. Ly · B.B. Lô

Reçu le 30 mars 2010 ; accepté le 19 octobre 2010

© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

**Résumé** Ce travail présente les résultats de l'enquête comportementale et sérologique sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH/sida) réalisée de décembre 2007 à décembre 2008 chez les consultants pour infections sexuellement transmissibles (IST), considérés comme à risque d'infection à VIH. En Mauritanie, la dernière enquête de séroprévalence chez les consultants IST remonte à l'année 1995, elle était alors estimée à 0,9 %. L'objectif était de déterminer la séroprévalence du VIH et de la syphilis et de recueillir des informations sur les connaissances et les comportements sexuels à risque de ces patients. Deux cent vingt-quatre consultants IST ont été recrutés sur un an, sans prédominance de sexe, et avec une majorité d'adultes jeunes. Les séroprévalences relevées sont respectivement de 9 % pour le VIH et de 10 % pour la syphilis. Le préservatif est peu utilisé par ces patients, même lors de rapports occasionnels. Ils constituent également un groupe à risque d'infection de VIH et de syphilis en raison de leurs comportements et de

leur faible niveau de connaissance. *Pour citer cette revue : Bull. Soc. Pathol. Exot. 104 (2010).*

**Mots clés** Infections sexuellement transmissibles · VIH/sida · Syphilis · Séroprévalence · Épidémiologie · Nouakchott · Nouadhibou · Mauritanie · Afrique

**Abstract** This work presents the results of the behavioural and serologic survey on HIV/AIDS conducted from December 2007 to December 2008 among the group of STD (sexually transmitted disease) patients, supposed to be at HIV infection risk. In Mauritania, the last survey of HIV seroprevalence among the STD patients goes up to the year 1995 (the prevalence was estimated then to be 0.9%). The goal was to determine the seroprevalence of HIV and syphilis and to gather information on the knowledge, the sexual behaviours on a risk concerning the HIV/AIDS, and the sexually transmitted disease among these patients. The census has been made on over 224 STD patients during the period of the study, without predominance of sex and with a majority of young adults. The prevalence for HIV is 9% and for the syphilis it is 10%. Actually, the condom is widely underused by this group, even in occasional intercourse. The STD patients are a group of risk towards HIV, because of their risk behaviours and low level of knowledge. *To cite this journal: Bull. Soc. Pathol. Exot. 104 (2010).*

**Keywords** Sexually transmitted diseases · HIV/AIDS · Syphilis · Seroprevalence · Epidemiology · Nouakchott · Nouadhibou · Mauritania · Africa

M. Kebe (✉) · O.H. Ebnou  
Service de dermatologie, centre hospitalier national,  
BP 612 Nouakchott, Mauritanie  
e-mail : marikebe@yahoo.fr

F.Z. Fall-Malick · O.I. Elghady · O.A. Bara · M. Lam ·  
M.O. Beibacar · M.Y. Diallo · B.B. Lô  
Laboratoire de virologie,  
Institut national de recherches en santé publique,  
BP 695 Nouakchott, Mauritanie

M. Keita · I. Sy  
NCCR Nord-Sud, CSRS/ITS,  
Institut national de recherches en santé publique,  
BP 695 Nouakchott, Mauritanie

A.J. Bellaty  
Service de dermatologie, centre hospitalier régional,  
Nouadhibou, Mauritanie

C. Ly  
ONG Santé sans frontière, BP 3790 Nouakchott, Mauritanie

## Introduction

En Mauritanie, la dernière enquête de séroprévalence au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez les

consultants avec des infections sexuellement transmissibles (IST) remonte à 1995 ; cette prévalence était alors estimée à 0,9 % [1].

Les IST sont un sujet tabou ; les patients préfèrent consulter des filières parallèles (pharmacies) pour y trouver un réconfort rapide et discret, plutôt que de se rendre dans une structure sanitaire. Les données épidémiologiques recueillies par la surveillance sentinelle de 2001 à 2007 chez les femmes enceintes montrent une séroprévalence relativement faible (0,62 %) et une tendance à la stabilisation de l'épidémie [2]. Des enquêtes combinées sociocomportementale, biologique et clinique, comme celle que nous présentons pour les consultants IST, ont été également antérieurement réalisées chez les marins, les camionneurs, les travailleuses du sexe, les prisonniers et les pêcheurs.

## Matériels et méthodes

Il s'agit d'une enquête prospective, anonyme, confidentielle et après consentement éclairé de chaque patient, tant pour les volets cliniques et comportementaux que pour le volet biologique et les prélèvements. Elle a porté sur les consultants IST à Nouakchott et à Nouadhibou de décembre 2007 à décembre 2008. Le recrutement a nécessité une sensibilisation des pharmacies, des centres de santé et des cliniques privées de consultations externes de gynécologie et de dermatologie pour référer les patients aux sites de l'enquête. Tout consultant pour un écoulement urétral, une ulcération génitale ou tout autre symptôme d'IST acceptant de participer à l'enquête a été inclus. Chaque enquêté a fait l'objet d'un examen clinique, d'un interview sur questionnaire et d'un prélèvement sanguin. L'anonymat et la confidentialité des données reposent sur un système de codage. Le diagnostic clinique et la prise en charge des IST sont basés sur l'approche syndromique. Le diagnostic de l'infection VIH repose sur un test Elisa de troisième génération (Genscreen Biorad®) et une confirmation par Westernblot ; celui de la syphilis repose sur un test RPR et un test TPHA. Le contrôle

de qualité externe a été assuré par le laboratoire de bactériologie et de virologie du centre hospitalier universitaire Le-Dantec de Dakar. Il a consisté à retester 10 % des échantillons négatifs au VIH, à la syphilis et à la totalité des échantillons positifs pour les mêmes paramètres. Les patients présentant une IST étaient pris en charge gratuitement sur le site de l'enquête. Une carte de référence était remise au patient lui permettant de retirer son résultat d'analyses biologiques s'il le souhaitait. Une autre carte lui a été confiée pour être remise à son partenaire sexuel (PS), l'invitant à consulter dans le même site.

Les patients séropositifs pour le VIH étaient adressés aux centres de traitement ambulatoire de Nouakchott et de Nouadhibou pour la prise en charge de l'infection à VIH.

Le test de Mantel Haenszel a été utilisé pour les comparaisons avec un seuil de 0,05.

## Résultats

L'enquête a permis de recruter 224 consultants présentant une IST, avec un sex-ratio de 1,01. Parmi les sujets, 37,1 % avaient moins de 30 ans.

### Résultats cliniques

Les motifs de consultations des patients sont résumés dans le Tableau 1.

### Résultats sérologiques

La séroprévalence de l'infection VIH est de 9 % et celle de l'infection syphilitique de 10 %.

La séroprévalence de l'infection VIH selon l'âge, le niveau d'instruction et la situation matrimoniale est résumée dans le Tableau 2.

**Tableau 1** Motif de consultation des patients / *Reason for patient consultation*

Symptômes	N	Sexe		%
		Masculin	Féminin	
Douleurs abdominales basses	23	8	15	19,30
Miction douloureuse (chaude pisse)	41	41	0	34,45
Ulcérations/plaies génitales	17	12	5	14,28
Pertes vaginales	32	0	32	26,89
Gonflement/ulcérations de l'aïne	3	2	1	2,52
Condylomes génitaux	3	2	1	2,52

N : nombre ; % : pourcentage.

**Tableau 2** Statut sérologique selon l'âge, la situation matrimoniale et le niveau d'instruction / *HIV status by age, marital status and education level*

		Statut VIH					
		Négatif		Positif		Total	
		N	%	N	%	N	%
Selon l'âge	< 20 ans	34	97,1	1	2,9	35	100
	21–40 ans	114	89,6	15	11,6	129	100
	≥ 41 ans	43	92,3	3	6,5	46	100
	Total	191	91	19	9	210	100
Selon la situation matrimoniale	Célibataire	56	89,8	6	10,2	62	100
	Marié (monogame ou polygame)	135	89,8	13	10,2	148	100
	Total	191	91	19	9	210	100
Selon le niveau d'instruction	Aucun	48	82,8	10	17,2	58	100
	École coranique	59	95,2	3	4,8	62	100
	Primaire	48	94,1	3	5,9	51	100
	Secondaire ou plus	36	90,9	3	9,1	39	100
Total		191	91	19	9	210	100

N : nombre ; % : pourcentage.

### Résultats de l'enquête comportementale

Parmi les enquêtés, 94,1 % ont entendu parler du VIH et 83 % des IST. Ils sont 97,3 % à affirmer qu'on peut se protéger du sida en ayant un PS fidèle et qui ne soit pas infecté par le VIH. Cependant, seulement 50 % des consultants informent leurs partenaires de leurs IST, alors que 21,2 % ont des PS en dehors de leurs conjoints. Ces PS sont dans la majorité des partenaires occasionnels et présentent eux-mêmes des IST dans 26,7 % des cas. Les enquêtés n'utilisent pas de préservatifs dans 75 % des cas lors des rapports extraconjugaux.

Le préservatif est qualifié de facilement accessible par 76,8 % ; 80,1 % d'entre eux savent qu'il a pour rôle de protéger contre les IST et 73,1 % des patients utilisant le préservatif masculin se le procurent dans les pharmacies.

### Discussion

Ces résultats confirment le fait que les consultants IST constituent un groupe à risque vis-à-vis de l'infection à VIH en Mauritanie en raison de leurs comportements et de leur bas niveau de connaissance.

La prévalence du VIH chez les consultants IST est très élevée (9 %) par rapport à la population générale dont la prévalence est estimée à moins de 1 % : elle est en augmentation par rapport aux données antérieures [3,4]. Une série d'enquêtes, réalisée en 2008, montre que les prévalences des marins (1,24 %), des camionneurs (0,35 %) et des pêcheurs (0,83 %) sont proches de celle de la population générale, alors que cette prévalence est relativement plus élevée chez les travailleuses du sexe (2,08 %) et chez les prisonniers

(3,9 %). Cependant, tous ces groupes ont une prévalence inférieure à celle des consultants IST. Les données pour la syphilis correspondent à une prévalence sérologique sans atteinte clinique patente. Ces sérologies positives à la syphilis sont toutes associées à une sérologie syphilitique positive chez le partenaire.

Certains comportements des personnes enquêtées peuvent expliquer cette séroprévalence élevée. En effet, notre étude a montré que 21,2 % de nos sujets avaient des partenaires extraconjuguax et qu'ils n'utilisaient pas de préservatif dans 75 % des cas. Il apparaît que les enquêtés privilégièrent comme moyen de prévention la fidélité et connaissent mal le préservatif.

### Conclusion

L'importante prévalence de l'infection par le VIH (9 %) trouvée dans le cadre de cette étude confirme que les consultants IST constituent un groupe à risque d'infection par le VIH en Mauritanie également.

Le faible niveau de connaissance et les comportements à risque favorisent une grande vulnérabilité face à l'infection par le VIH.

Au terme de ce travail, certaines recommandations peuvent être formulées :

- renforcer la sensibilisation sur les IST/VIH/sida ;
- promouvoir l'usage du préservatif ;
- sensibiliser au dépistage volontaire du VIH/sida ;
- décentraliser la prise en charge des consultants IST et de leurs partenaires.

## Références

1. Lô BB, Philippon M, Cunin P, et al (1997) Étiologie microbienne des écoulements génitaux à Nouakchott, Mauritanie. Bull Soc Pathol Exot 90(2):81–2 [<http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T90-2-1809.pdf>]
2. Fall-Malick FZ, Bara AO, Lam M, et al (2010) Surveillance sentinelle du VIH chez les femmes enceintes en Mauritanie entre 2001 et 2007. Bull Soc Pathol Exot 103(1):42–3
3. Onusida (2008) Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2008. Genève, Onusida, juillet 2008
4. Onusida (2009) Le point sur l'épidémie mondiale de sida 2009. Genève, Onusida, décembre 2009



## **Résistance aux antirétroviraux et diversité génétique chez les patients traités en Mauritanie.**

9

### **III.3 Article N°3 : Mutations de résistance aux antirétroviraux et diversité génétique chez les adultes traités pour une infection par le VIH de type 1 en Mauritanie.**

**Journal of Medical Virology**

---

## **Drug Resistance Mutations and Genetic Diversity in Adults Treated for HIV Type 1 Infection in Mauritania**

---

**F-Zahra Fall-Malick,<sup>1</sup> Edmond Tchiakpé,<sup>2</sup> Sid'Ahmed Ould Soufiane,<sup>3,4</sup> Halimatou Diop-Ndiaye,<sup>2</sup>  
Abderrahmane Mouhamedoune Baye,<sup>3</sup> Abdallah Ould Horma Babana,<sup>5</sup> Coumba Touré Kane,<sup>2\*</sup>  
Baidy Lo,<sup>4</sup> and Souleymane Mboup<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratory of Virology, Public Health National Institute (INRSP), Nouakchott, Mauritania*

<sup>2</sup>*Laboratory of Bacteriology-Virology, University Hospital Center Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal*

<sup>3</sup>*Ambulatory Treatment Center, National Hospital Center of Nouakchott, Mauritania*

<sup>4</sup>*Faculty of Medicine, Nouakchott, Mauritania*

<sup>5</sup>*Military Hospital of Nouakchott, Mauritania*

---

**2014. 86 (3) : 404-10.**

#### **III.3.1 Probématique**

Le passage à l'échelle des traitements antirétroviraux (ARV) a permis la réduction significative du nombre de décès liés au VIH/SIDA et l'augmentation de l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH. Cependant, le succès des ARV peut être compromis par l'échec virologique et l'émergence de virus porteurs de mutations de résistance (**Jordan MR, 2011**). Pour limiter l'émergence de la résistance, le monitoring virologique est systématique dans les pays développés pour tous les patients traités. Cette approche vise à optimiser l'efficacité des premières lignes et guider les traitements de relais de seconde et troisième lignes (**Revel AD et coll., 2010**). Dans les pays à faibles ressources, la charge virale et le génotypage de résistance ne sont pas disponibles en routine et le suivi des patients traités est principalement basé sur le dosage des CD4 et la clinique (**Kouanfack C et coll., 2009 ; Barth RE et coll., 2010**).

En Mauritanie le traitement ARV a été mis en place en début 2005 et en fin 2009, le nombre de patients recevant les ARV était de 1162 sur une cohorte de 2797 PVVIH. Ces patients étaient suivis au niveau du Centre de traitement Ambulatoire (CTA).<sup>62</sup> A l'instar de la plupart des pays africains, seuls deux lignes de traitements sont disponibles dans le pays et les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase constituent l'épine dorsale des traitements de première ligne. La charge virale a été introduite en 2008 alors que le génotypage de résistance n'est pas encore disponible et aucune donnée publiée sur les mutations de résistance aux ARV n'existe.

### **III.3.2 Objectif**

L'objectif de cette étude était d'évaluer les profils de résistance observés et de documenter la diversité génétique chez les patients mauritaniens (cohorte nationale de santé publique), sous traitement antirétroviral présentant un échec virologique.

### **III.3.3 Méthodologie**

L'étude avait porté sur 86 patients recrutés entre janvier 2009 et mars 2010. Les échantillons ont été sélectionnés sur la base d'une CV > 3 log<sub>10</sub> copies/ml, déterminée par la technique Cobas® Ampliprep®/Cobas® TaqMan® 48 (CAP-CTM) HIV-1 quantitative assay (Roche Molecular Diagnostics, Basel, Switzerland). L'ARN a été extrait par le kit QIamp viral RNA de QIAGEN®, amplifié et séquencé selon la technique de génotypage ARNS AC 11<sup>63</sup> sur des fragments du gène pol (totalité de la protéase et 240 premiers acides aminés de la Transcriptase Inverse). Les mutations génotypiques de résistance ont été obtenues par soumission des séquences au site de l'Université de Stanford.<sup>64</sup> L'analyse des mutations de résistance a fait recours à la dernière version de l'algorithme de l'ANRS-AC11.<sup>65</sup>

Pour l'analyse phylogénétique, les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Seaview v4.4.1 pour déterminer les différents sous-types, CRFs et URF. Les séquences nucléotidiques ont été alignées avec des séquences de référence intégrant tous les sous-types purs et CRFs qui circulent en Afrique de l'Ouest et disponibles dans la base de données de Los Alamos.<sup>66</sup>

<sup>62</sup> [http://www.internationalhealthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country\\_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf](http://www.internationalhealthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf) (Consulté le 14/12/2013).

<sup>63</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> (Consulté le 17/07/2013).

<sup>64</sup> <http://hivdb.stanford.edu/> (Consulté le 17/07/2013).

<sup>65</sup> <http://www.hivfrenchresistance.org/> ((Consulté le 17/07/2013)).

<sup>66</sup> <http://www.hiv.lanl.gov/content/index> (Consulté le 17/07/2013).

Pour déterminer si les virus étaient recombinants ou non, l'analyse de similarité et le bootscanning ont été réalisés avec le logiciel Simplot 2.6. L'arbre phylogénétique final a été élaboré selon la méthode du plus proche voisin ou Neighbor-jonning sur Seaview V4.4.1.

### III.3.4 Résultats

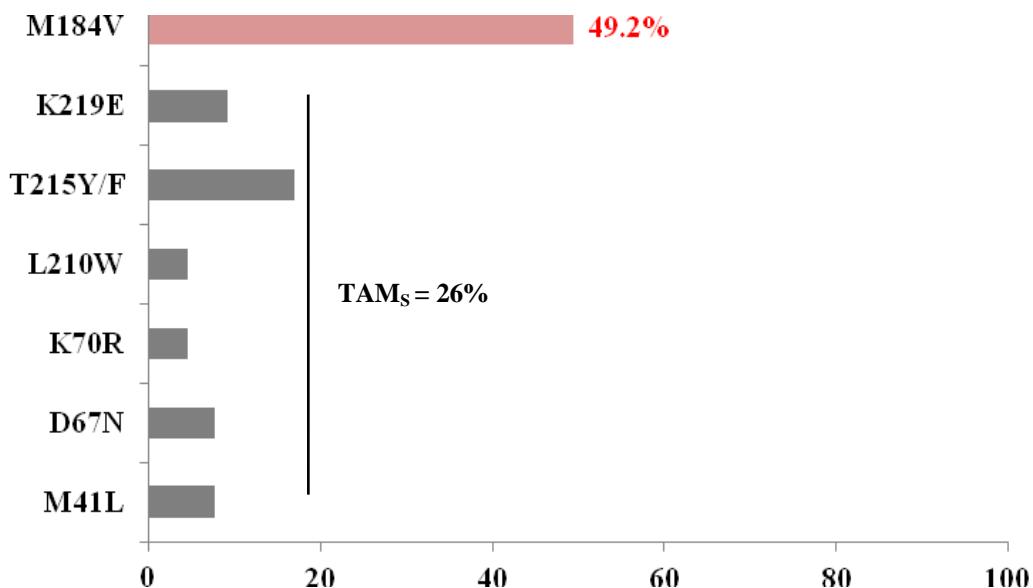
Quatre vingt six (86) patients avec une médiane d'âge de 38 (21-64) ans, en majorité hommes 58 (67%) ont été enrôlés dans le cadre de cette étude. Soixante dix neuf patients (92%) étaient sous traitement de première ligne (INTI + EFV / NVP) dont 26 (33%) sous Triomune dose fixe et 7 (8 %) sous deuxième ligne de traitement avec un régime à base d'inhibiteur de protéase (IP) boosté au ritonavir. Après une médiane de suivi de 32 (6-88) mois, les médianes de charge virale ARN et de lymphocytes T CD4 étaient respectivement de 4.94 (3.1 à 7) log copies/ml et 180 (18 à 1082) cellules/mm<sup>3</sup>.

Sur les 86 échantillons de plasma, 65 ont été amplifiés puis séquencés (58 sur le gène de la protéase et le gène partiel de la RT et 7 au niveau du gène partiel de la RT). Ces échantillons correspondaient à 59 patients (91%) sous première ligne de traitement dont 19 (32%) sous Triomune dose fixe. Selon les recommandations de l'OMS 2010 révisées, parmi les 65 échantillons de plasmas 10 (15.4%) présentaient une charge virale comprise entre 3 et 3.67 log<sub>10</sub> copies/ml et cinquante-cinq (84,6 %) une charge virale supérieure à 3.7 log<sub>10</sub> (5000) copies/ml.

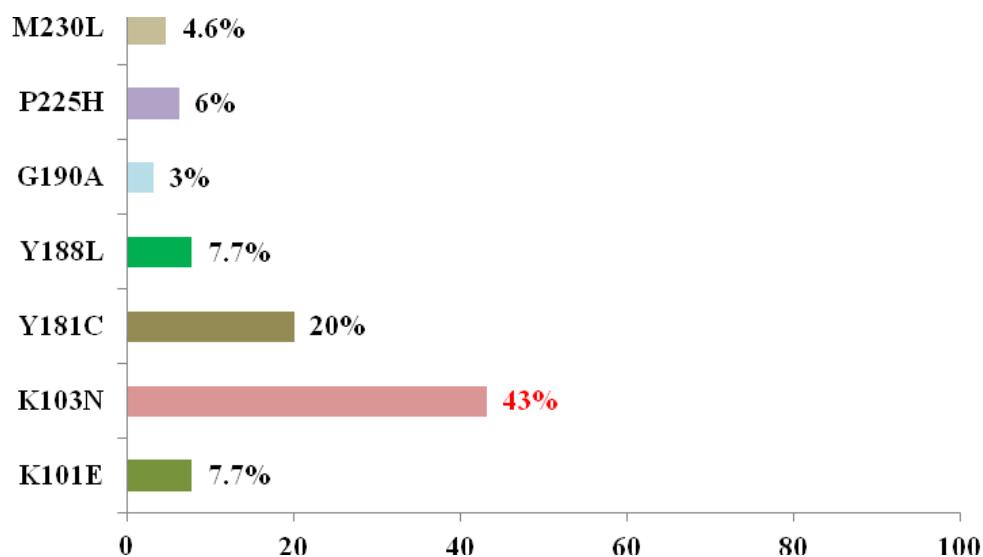
Le taux global des mutations de résistance (MDR) était de 72.3% avec 47 souches portant au moins une mutation de résistance. Pour la première ligne, le taux de MDR était de 73.0% (43/59) avec 50.8 % (n=30) et 71.2% (n=42) respectivement pour les INRT et les INNRT. Une combinaison de mutations de résistance (INTI et les INNTI) a été observée pour 49.1% (29/59) échantillons. Pour la deuxième ligne, sur les 6 patients, 4 ont présenté des mutations de résistance aux INRT et/ou aux INNRT, dont un seul portant des MDR aux IP (L10I, M46I, I54V et V82A).

Les plus fréquentes mutations de résistance rencontrées étaient respectivement, la M184V/I (n = 32; 49.2%), K103N (n = 28; 43.1%) et Y181C (n = 13; 20.0%). Les mutations associées aux analogues de la thymidine (TAM) ont été retrouvés à 26.1% (n = 17) et la plus commune était la T215Y (n = 11, 16.9%) **Figure 30.**

Selon la durée du traitement, 41 (63.1%) patients étaient à plus de 24 mois de suivi, mais une accumulation de MDR a été trouvé avec une différence significative seulement pour la mutation M184V [p = 0.035].



**A Inhibiteurs Nucléosidiques de la Reverse Transcriptase**



**B Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Reverse Transcriptase**

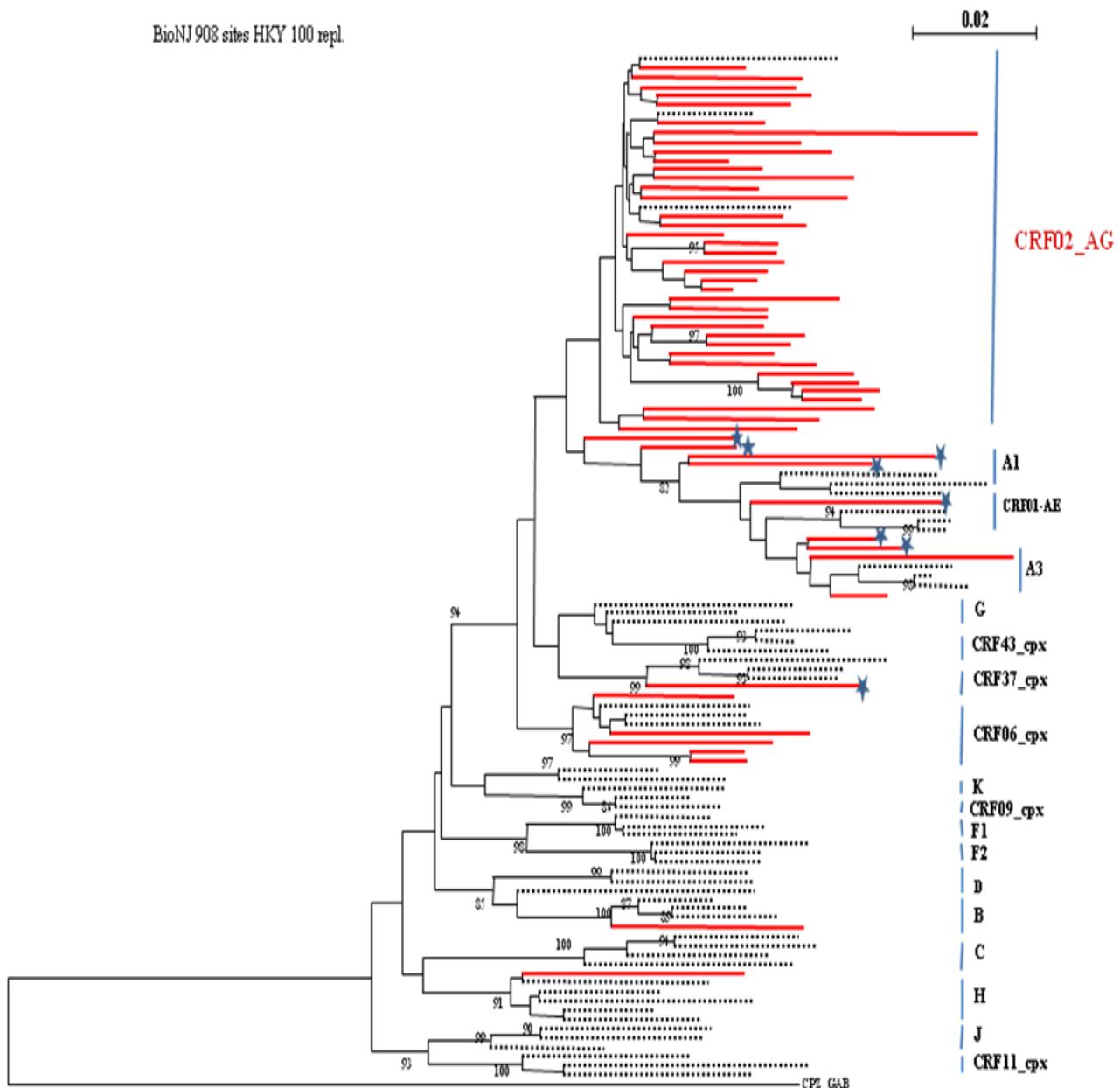
**Figure 29 : Pourcentages de résistance associées aux inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase (A) et aux inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase (B).**

Les MDR retrouvées ont été analysées pour la prédiction du schéma thérapeutique future ou le changement thérapeutique.

Pour la deuxième génération d'INNTI, la Y181C ou la M230L ont été trouvées chez 11 patients en première ligne conférant une diminution de la sensibilité à l'Etravirine et aussi une résistance à la Rilpivirine qui ne peut pas être utilisée en deuxième ligne thérapeutique pour ces patients. Par ailleurs, un patient traité par Triomune dose fixe a présenté la combinaison de L74V/I et Y181C qui compromet l'utilisation future de l'Abacavir et de la deuxième génération des INNTI. La Y181C a également été trouvée chez 2 autres patients sous deuxième ligne de traitement. Le patient qui était sous IND/r et LPV/r, présentait une résistance intermédiaire à la LPV/r mais sa souche reste sensible à la dernière génération d'IP (Darunavir, Tipranavir et Atazanavir) et aux INNTI.

Cinquante huit (58) échantillons ont été séquencés en protéase et en partielle RT. Parmi eux, 3 ne sont pas représentés sur l'arbre correspondant à la **figure 30**. Leur distribution était la suivante : CRF02\_AG (n=1), CRF06\_cpx (n=1), C/UC (n=1). La distribution globale des 55 échantillons représentés sur l'arbre phylogénétique (**figure 31**) était la suivante : CRF02\_AG (n=38), CRF06\_cpx (n=5), A3 (n=2), B (n=1), H (n=1). Huit (8) autres variants correspondant à des formes recombinantes uniques (ou URF) ont également été retrouvés : U/CRF01\_AE (n=1), CRF02\_AG/A3 (n=2), CRF02\_AG/A3/CRF02\_AG (n=1), A3/G (n=3), and CRF37\_cpx/U (n=1).

Les 7 séquences restantes obtenues que dans le gène de la transcriptase inverse appartenaient aux sous-types suivants : CRF02\_AG (n=3), CRF11\_cpx (n=1), A3 (n=1), C (n=1) et D / A1 (n=1). Globalement, l'analyse phylogénétique a révélé que le CRF02\_AG était le variant prédominant (n=42; 64.6%). Il était suivi par le CRF06\_cpx (n=6; 9.2%). En outre, le taux de formes recombinantes uniques était de 15.4% (n= 10).



**Figure 30 : Arbre Neighbor Joining construit à partir des 55 séquences sur un fragment *pol* (protéase et RT partielle) de 1011 pb, montrant la variabilité et la relation phylogénétique entre les souches de l'étude.**

### **III.3.5 Publication**

**Fall Malick Z, Ould Soufiane S.A, Diop-Ndiaye H, Ould Abdallah MV, Mouhamedoune Baye A, Tchiakpé E, Ould Horma Babana, Lo B, Mboup S, Touré-Kane C.** Résistance secondaire aux antirétroviraux et diversité génétique chez les patients HIV-1 mauritaniens de la cohorte nationale.

**Best of Poster N° PP\_07.** *7th International Workshop on HIV treatment, Pathogenesis and Prevention Research in Resource-Limited Settings (INTEREST).* **14-17 mai 2013, Dakar, Sénégal:**  
**2013.**

# Drug Resistance Mutations and Genetic Diversity in Adults Treated for HIV Type 1 Infection in Mauritania

F-Zahra Fall-Malick,<sup>1</sup> Edmond Tchiakpé,<sup>2</sup> Sid'Ahmed Ould Soufiane,<sup>3,4</sup> Halimatou Diop-Ndiaye,<sup>2</sup> Abderrahmane Mouhamedoune Baye,<sup>3</sup> Abdallah Ould Horma Babana,<sup>5</sup> Coumba Touré Kane,<sup>2\*</sup> Baidy Lo,<sup>4</sup> and Souleymane Mboup<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Virology, Public Health National Institute (INRSP), Nouakchott, Mauritania

<sup>2</sup>Laboratory of Bacteriology-Virology, University Hospital Center Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal

<sup>3</sup>Ambulatory Treatment Center, National Hospital Center of Nouakchott, Mauritania

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, Nouakchott, Mauritania

<sup>5</sup>Military Hospital of Nouakchott, Mauritania

The aim of this cross-sectional study was to evaluate the drug resistance mutation profile observed in patients receiving antiretroviral therapy with virological failure and to document the HIV-1 genetic diversity in Mauritania. Eighty-six subjects were included and 65 samples were amplified successfully and sequenced. HIV-1 genotyping was performed using the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA AC11 resistance procedure. The median treatment duration was 32 months (range: 6–88) and the median viral load, 5 log<sub>10</sub> copies/ml (range: 3.13–7). Fifty-nine patients (90.8%) were on first line regimens including 32.0% (19/59) on triomune fixed-dose and six on second-line therapy with NonNucleoside Reverse Transcriptase plus a protease inhibitor. Forty-seven patients (72.3%) had at least one drug resistance mutation including 73.0% (43/59) on first-line therapy. For the second-line, one out of six patients presented resistance mutations and only one presented PI DRM. Overall, the most common DRMs detected were M184V/I (n=32; 49.2%), K103N (n=28; 43%), and Y181C (n=13; 20%). Thymidine Analog Mutations (TAMs) were found in 26.2% (n=17) of strains and the most common was T215Y (n=11, 16.9%). Phylogenetic analysis revealed 17 HIV-1 variants with the predominance of CRF02\_AG (n=42; 64.6%). A high rate of DRM was found in this study and shows the potential need for a structured virological surveillance including viral load quantification and genotyping. Further studies may also be needed in regards to the great variability of HIV-1 strains in Mauritania. **J. Med. Virol.** **9999:** XX–XX, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** HIV-1; genetic diversity; therapeutic failure; Mauritania

## INTRODUCTION

The antiretroviral therapy scale-up has reduced significantly the number of deaths related to HIV/AIDS and improved the life expectancy of people living with HIV. In sub-Saharan Africa, the number of people dying from AIDS-related causes declined by 32% from 2005 to 2011 [UNAIDS, 2012b]. However, the success of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) could be compromised by the emergence of HIV drug resistance mutations [Jordan, 2011]. These drug resistance mutations can occur during treatment [Mohamad et al., 2012] and can also be transmitted to a treatment naïve population [Mamadou et al., 2011; Maiga et al., 2013]. Resistance has been identified to all antiretroviral (ARV) drug classes, even those discovered recently [Johnson et al., 2011]. Numerous studies have shown the extent of resistance for both

Grant sponsor: Committee Against HIV/AIDS (Mauritania); Grant sponsor: World Bank Multi-Aids Project (MAP); Grant sponsor: Laboratory of Bacteriology-Virology, University Hospital Center Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal cofinanced the study

The authors declare no conflicts of interest.

\*Correspondence to: Coumba Touré Kane, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, and Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar, Senegal.

E-mail: ctourekane@yahoo.co.uk

Accepted 8 November 2013

DOI 10.1002/jmv.23860

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).

first and second line regimens [Johannessen et al., 2009; Soares et al., 2010]. To limit the emergence of HIV drug resistance strains, virological monitoring (viral load and genotyping) is required, a process that is routinely used in developed countries for all HIV treated patients. This approach aims to optimize the efficiency of the first line regimens and drive the relay processing to second or third line treatment [Revell et al., 2010]. In developing countries, viral load and genotypic resistance testing are not conducted routinely and the management of HIV treated patients is primarily based on the CD4 cell count and clinical monitoring [Kouanfack et al., 2009; Barth et al., 2010]. Therefore, patients can be maintained on first line treatment for a long period of time, despite potential unmonitored HIV virological failure.

In Mauritania, the HIV epidemic is concentrated with a prevalence of 1.1% [0.6–2.0%] in the general population [UNAIDS, 2011] and more than 5% in key groups such as Female Sex Workers [UNAIDS, 2012a] and patients attending the sexually transmitted infection (STIs) clinics [Kebe et al., 2011]. The HIV antiretroviral treatment medical care began in December 2004 in Mauritania and the number of patients receiving ARV treatment was 1,162 out of the 2,797 by late 2009. At the time, all HIV infected patients were followed at the Centre de Traitement Ambulatoire (CTA) [Ministère de la Santé-Mauritanie, 2011]. As in many other African countries, only two lines of treatment are available in Mauritania according to WHO recommendations. The first generation of Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) is the back-bone of the first line regimen. Viral load testing was introduced in Mauritania in late 2008, and genotypic resistance testing is still not available. There is currently no published data describing drug resistance mutations in Mauritania. For these reasons, clinicians are faced with the challenge of diagnosing therapeutic failure and making timely decisions to change patient treatment. To address this gap of knowledge, the objective of this study was to evaluate the drug resistance mutation profile observed in patients receiving antiretroviral therapy with virological failure and document the genetic diversity for the first time in Mauritania.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

HIV-1-infected adult patients followed at the Centre de Treatment Ambulatoire (the main health care structure for HIV-infected patients) in Nouakchott, the capital of Mauritania, were enrolled in the study from January 2009 to March 2010, after signing written consent. The study falls within the framework of the national Mauritanian antiretroviral treatment program and was approved by the Health Unit against HIV/AIDS under the supervision of the Ministry of Health. In addition, all the laboratory

investigations directly benefited the patients, and allowed the orientation of individual therapeutic regimen.

### Blood Sampling and Processing

Blood samples were collected by venipuncture into ethylene diamine tetra acetic (EDTA) tubes. After centrifugation, plasma was separated, aliquoted and kept frozen at –80°C until processing.

### Viral Load and Resistance Testing

Plasma HIV-1 RNA viral load (VL) was performed using the Cobas TaqMan® 48/Cobas® Ampliprep® (CAP/CTM) HIV-1 quantitative assay (Roche Molecular Diagnostics, Basel, Switzerland), according to manufacturer's instructions. Any sample with VL superior to 3 log copies/ml was included in the analysis. This threshold is in concordance with the WHO revised recommendations in 2013 [WHO, 2013].

Genotypic resistance testing was performed on plasma samples using the consensus technique of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS, Paris, France), as previously described (<http://www.hivfrenchresistance.org/>). Briefly, RNA extraction was performed using the QiaAmp Viral RNA kit (Qiagen, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. The entire protease gene and at least the first 240 amino acids encoded the reverse transcriptase (RT) gene were amplified, PCR products were purified (Qiagen) and directly sequenced on ABI3100-Avant using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The generated sequences were edited using the SeqMan II 5.0.8 software program from DNAsstar software v.5.0.8 (Lasergene, Konstanz, Germany). Genotypic resistance profiles were obtained from the Stanford University HIV drug resistance database version 6.0.8 website (<http://hivdb.stanford.edu/>) and analyzed according to the last version of the ANRS-AC11 resistance algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org/>).

### Phylogenetic Analysis

Nucleotide sequences were aligned with a set of reference sequences of HIV-1 group M subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) downloaded from Los Alamos HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). All pure subtypes and CRFs circulating in West Africa were included in the analysis with at least three reference sequences per subtype/CRF. Sequences were aligned with MUSCLE and gap positions removed by using the Gblocks program on SEAVIEW v4.4.1. Neighbor-joining trees with 100 bootstrap replicates were also generated on SEAVIEW v4.4.1. To determine whether the viruses were recombinant or not, similarity analysis and bootscanning were performed with Simplot software (version 3.5.1).

The sequences HIV-1 generated in this study were deposited in European Molecular Biology Laboratory (EMBL) under the following numbers: HG518329 to HG518396.

## RESULTS

### Patient Characteristics

Eighty-six patients (median age, 38, range: 21–64 years; with a sex-ratio of 2.07) were enrolled in this study. According to the therapeutic regimen, seventy-nine patients (91.9%) were on first-line antiretroviral treatment with Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) plus NNRTI (Efavirenz or Nevirapine) including 26 (33.0%) on triomune fixed-dose, whereas 7 (8.1%) were on second-line treatment with ritonavir boosted-protease inhibitor (PI) regimen. After a median follow-up of 32 months (range, 6–88), the median HIV-1 RNA load was  $4.94 \log_{10}$  copies/ml (range, 3.1–7 log copies/ml) and the median CD4T cell count was 180 (range, 18–1,082 cell/mm<sup>3</sup><sup>3</sup>).

Of the 86 plasma samples, 65 were successfully amplified and further sequenced including seven in partial RT gene only and 58 in full protease gene and partial RT. These samples are from 59 patients (90.8%) on first line regimen, with 19 (32%) on Triomune (d4T + 3TC + NVP)-fixed dose regimen; and 6 (9.2%) on second line ARV treatment. According to the 2010 revised WHO criteria [WHO, 2010], plasma HIV-1 VL was between 3 and  $3.67 \log_{10}$  copies/ml in 10 cases (15.4%) and greater than  $3.7 \log_{10}$  (5,000) copies/ml in 55 (84.6%) cases. Table I described the therapeutic regimen and main virological findings of these patients.

### Antiretroviral Drug Resistance Mutations

Table I summarizes the drug resistance mutations (MDR) harbored by the study population. Therefore 72.3% (n=47) had at least one DRM. For the first line, the rate of DRM was 73.0% (43/59) with 50.8% (n=30) and 71.2% (n=42) for NRTIs and NNRTIs, respectively. Moreover, 49.1% (29/59) showed a combination of resistance mutations for both NRTI and NNRTI.

For the second-line, four out of six patients that presented resistance mutations had NRTI and/or NNRTI DRM but only one harbored PI DRM with L10I, M46I, I54V, and V82A. This patient was treated after the first line regimen by IND/r and is currently under LPV/r and harbored strains with NRTI DRM.

Overall, the most common detected DRM were M184V/I (n=32; 49.2%), K103N (n=28; 43.1%), and Y181C (n=13; 20%). The other mutations detected in the RT gene include K101E (n=5; 7.7%), V108I (n=5; 7.7%), and V75I, V106M, G190A, Y188L, albeit at lower frequencies. Thymidine analog mutations (TAMs) were found in 26.1% (n=17) and the most common was T215Y (n=11, 16.9%; Fig. 1). Three patients harbored drug resistant strains with TAM,

TABLE I. Therapeutic, Virological, Drug Resistance, and Therapeutic Patient Group Data

Parameter	No. (%) of patients	
	First-line ART (n = 59)	Second-line ART (n = 6)
Viral load ( $\log_{10}$ )		
3–3.67	10 (16.9)	—
3.67–5	14 (23.7)	3 (50.0)
>5	35 (52.3)	3 (50.0)
Treatment		
D4T + 3TC + NVP	19 (32.2)	
D4T + 3TC + EFV	14 (23.7)	
AZT + 3TC + NVP/EFV	24 (40.7)	
FTC + TDF + EFV	1 (1.7)	
3TC + DDI + NVP	1 (1.7)	
AZT + 3TC + IND/r		1 (1.7)
D4T + 3TC + LPV/r		1 (1.7)
FTC + 3TC + LPV/r		1 (1.7)
ABC + TDF + LPV/r		1 (1.7)
ABC + DDI + IND/r		1 (1.7)
ABV + DDI + LPV/r		1 (1.7)
ART times (months)		
6–12	7 (11.9)	1 (16.7)
13–24	16 (27.1)	—
>24	36 (61.0)	5 (83.3)
DRMs		
NRTIs	30 (50.8)	3 (50.0)
NNRTI	42 (71.2)	3 (50.0)
NRTIs + NNRTs	29 (49.1)	1 (16.7)
NRTIs + PI/r	—	4 (66.7)
Any DRM	43 (72.9)	—

ART, antiretroviral treatment; DRM, drug resistance mutations; ZT, zidovudine; 3TC, lamivudine; FTC, emtricitabine; d4T, stavudine; NVP, nevirapine; EFV, efavirenz; DDI, didanosine; TDF, tenofovir; ABC, abacavir; LPV/r, lopinavir/ritonavir; IDV/r, indinavir/ritonavir.

one through the TAM-1 pathway (M41L, L210W, and T215Y), a second through the TAM-2 pathway (D67N, K70R, Y215F, and K219E) and a third with mutations in both pathways. This later patient was the one who experienced both IND/r and LPV/r. According to treatment duration, 41 of 65 (63.1%) patients were greater than 24 months of follow up but an accumulation of DRM was found with a significant difference only for the M184V (*P*-value = 0.035; Fig. 2).

The DRM found were analyzed for the prediction of future therapeutic regimen or therapeutic switching. For the second generation of NNRTI, the Y181C or the M230L were found in 11 patients in first line conferring a decrease of susceptibility for etravirine and also a resistance to rilpivirine that cannot be used in second line therapeutic for these patients.

One patient treated by fixed dose triomune presented the combination of L74V/I and Y181C which compromised the future use of Abacavir and the second generation of NNRTI. The Y181C was also reported in two other patients in second line regimen.

For the patient with both IND/r and LPV/r, there was an intermediate resistance to LPV/r but the strain remains sensitive to the last generation of PI (darunavir, tipranavir, and atazanavir) and the NNRTI.

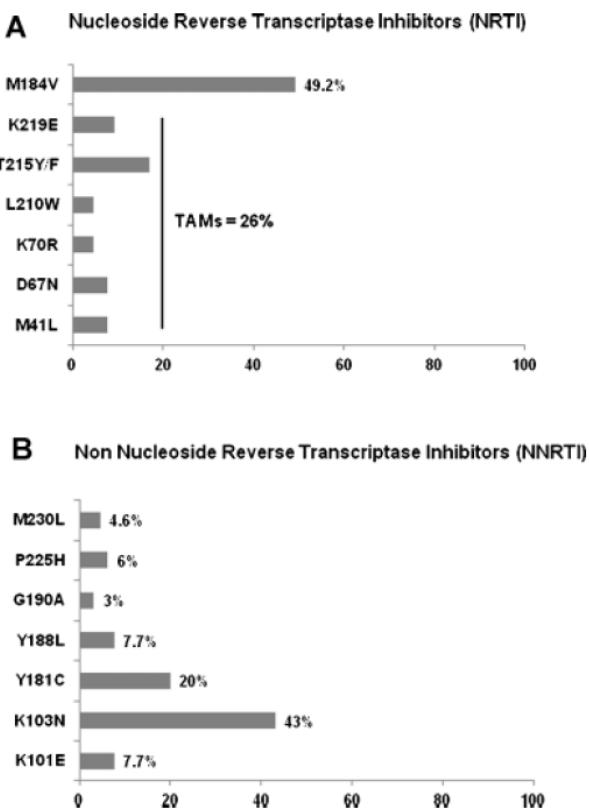


Fig. 1. Percentages of resistance-associated mutations to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (A) and to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (B).

### Phylogenetic Analysis of the Protease and Reverse Transcriptase Sequences

Fifty-eight samples were sequenced for full protease (PR) and partial reverse transcriptase (RT). Among them, three did not overlapped for generating a full protease—partial RT fragment. Therefore phylogenetic

tree was built with the 55 remaining sequences presenting a full protease-partial RT fragment. This phylogenetic tree is presented in Figure 3. The phylogenetic distribution of these three samples was CRF02<sub>-</sub>AG, CRF06<sub>-</sub>cpx and C/UC. The general distribution of the 55 overlapping sequences was as follow: CRF02<sub>-</sub>AG (n=38), CRF06<sub>-</sub>cpx (n=5), A3 (n=2), B (n=1), H (n=1). Eight other variants corresponding to unique recombinant forms (URF) were also found with U/CRF01<sub>-</sub>AE (n=1), CRF02<sub>-</sub>AG/A3 (n=2), CRF02<sub>-</sub>AG/A3/CRF02<sub>-</sub>AG (n=1), A3/G (n=3), and CRF37<sub>-</sub>cpx/U (n=1). In addition, the seven samples with only partial reverse transcriptase sequences gave the following distribution: CRF02<sub>-</sub>AG (n=3), CRF11<sub>-</sub>cpx (n=1), A3 (n=1), C (n=1), and D/A1 (n=1). Overall CRF02<sub>-</sub>AG was the predominant variant (n=42; 64.6%) followed by CRF06<sub>-</sub>cpx (n=6; 9.2%) and the rate of unique recombinant forms was 15.4% (n=10).

### DISCUSSION

This cross-sectional study investigated the prevalence of HIV-1 drug resistance mutations and the genetic variability among Mauritanian patients undergoing HAART in the public health system. Eighty-six samples with viral load  $\geq 3 \log_{10}$  copies/ml from patients undergoing ART and suspected of treatment failure were included. Using only the 2010 revised WHO criteria, 10 cases of virological failure would be missed according to their VL between 3 and  $3.7 \log_{10}$  copies/ml. For the first line regimens, the stavudine (d4T) was the major NRTI (55.93%) and 30% of patients were treated with Triomune fixed-dose. This feature was also found in many other resource-limited countries [Dagnra et al., 2011; Messou et al., 2013] before the 2010 WHO recommendation on the d4T phase out (<http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/index.html>).

A high rate of drug resistance mutations (72.30%) was found among the 65 samples successfully sequenced after a median follow up of 32 months. Similar results were found in countries using the same first-line regimen containing two NNRTIs and one NNTI, such as Senegal, after a median of treatment duration of 40 months [Thiam et al., 2013] and other resource-limited settings [El-Khatib et al., 2010; Pere et al., 2012]. For patients receiving first line regimens, the M184V mutation was the most prevalent followed by K103N and Y181C; for TAMs, the T215Y was the most frequent mutation observed. These results are similar to those found in Senegal and other African countries [El-Khatib et al., 2010; Chaplin et al., 2011; Thiam et al., 2013].

An association was observed between the M184V mutation and the treatment duration, however it was not the case for the TAMs, probably due to the small sample size in this study (Figure 2). Indeed, without virological monitoring, continuous treatment in the presence of viral replication is associated with

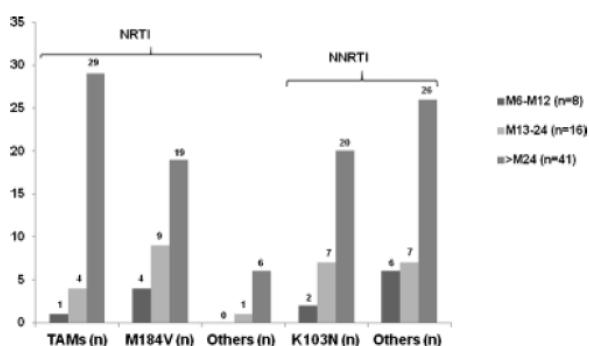


Fig. 2. Frequency of drug resistance mutations according to the treatment duration among HIV-1 infected adult patients living in Mauritania and taking antiretroviral drug therapy. TAMs, thymidine analog mutations; NRTI, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors.

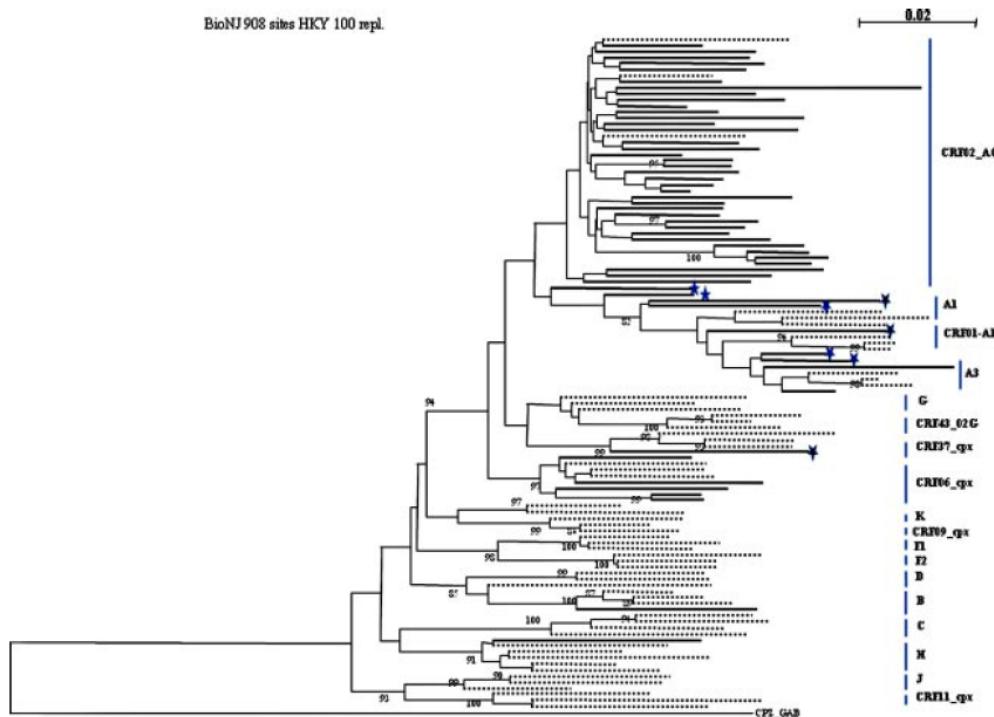


Fig. 3. Neighbor Joining tree built with 1,011 bp of protease and partial RT gene illustrating the phylogenetic relationships between the sequences in the study. The length of the alignment was 1,011 bp. HIV-1 reference sequences are indicated by dashed lines and studied sequences by solid lines. Unique recombinant forms were indicated by asterisks.

stepwise accumulation of resistance mutations [Sturmer et al., 2007]. This accumulation of resistance mutations may compromise the effectiveness of second line drugs [Petersen et al., 2008; Sigaloff et al., 2011; Hosseinpour et al., 2013].

Among the six patients on second line therapies, one had resistance mutations to ABC and TDF, requiring third-line treatment unavailable in the country. In total, 12 patients receiving first line and 2 on second-line therapeutic presented mutations that compromise the future therapeutic regimen and required ARV drugs that are not available in the country and in many resource-limited settings.

This study has also showed a predominance of the CRF02\_AG (42/63, 64.6%) and the circulation of 17 subtypes/CRFs including 10 URFs, which represent very high genetic diversity. The dominance of the CRF02\_AG type has also been described in many other countries in West Africa and West central Africa [Mamadou et al., 2011; Kebe et al., 2013; Maiga et al., 2013; Tongo et al., 2013]. CRF06\_cpx is the second most prevalent strain of HIV-1 isolated in our study and was found at a similar frequency in Niger [Mamadou et al., 2011]. In contrast, only one subtype B strain was identified in Mauritania, although it is still the major variant circulating in the northern neighboring countries such as Algeria, Morocco and Tunisia [Mumtaz et al., 2011; El Annaz

et al., 2012]. A rate of 15.4% of unique recombinant forms were also found with a similar rate to that reported in Senegal [Thiam et al., 2013], but lower than the one reported in Mali [Maiga et al., 2012].

In conclusion, this study documents for the first time the HIV-1 drug resistance profile and genetic diversity in patients within the public health system in Mauritania. Despite the small number of genotyped samples, a high rate of drug resistance mutations was observed. These results demonstrate the necessity importance of establishing a structured virological monitoring system, as recommended in the revised WHO recommendations with VL quantitation at least once a year [WHO, 2013] including genotypic resistance test if possible. There is also a need to improve the compliance support for better patient care in the Mauritanian national cohort. The great variability of HIV-1 strains indicates the need for further studies to better document the genetic diversity in the country.

### Study Group

Dr Barrikallah Ould Ely Leytim, Dr Mohamed Vall Ould Mazzouz, Dr Abdallah Ould Meissa, (Centre de traitement Ambulatoire, Nouakchott, Mauritania); Oumoulkhairatt Mint Beibacar, Dr Kelly Mamadou (Laboratoire de Virologie, Institut National

de Recherches en Santé Publique, Nouakchott, Mauritania).

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the National Executive Secretor against AIDS Dr. Ndoungou Salla Ba, all patients who participate of this study and all of the people who contributed to the successful completion of this study, in particular the staff of Centre de Traitement Ambulatoire of Nouakchott, Mauritania (Jiddou Ould Mohamed Lemine Ould Sidi Abdallah, Néné Kane, Minetou Mint Babe, Hachim Diacko, Mohamed Limam, and Alaoui Malick Dia), l'Institut National de Recherches en Santé Publique of Nouakchott, la Direction de Lutte contre la Maladie (DLM) of Ministère de la Santé of Mauritania, respectively. We would like to thank CHAIN project and Dr. Amy K. Bei for critical reading of the manuscript.

### REFERENCES

- Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM. 2010. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 10:155–166.
- Chaplin B, Eisen G, Idoko J, Onwujekwe D, Idigbe E, Adewole I, Gashau W, Meloni S, Sarr AD, Sankale JL, Ekong E, Murphy RL, Kanki P. 2011. Impact of HIV type 1 subtype on drug resistance mutations in Nigerian patients failing first-line therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:71–80.
- Dagnra AY, Vidal N, Mensah A, Patassi A, Aho K, Salou M, Monleau M, Prince-David M, Singo A, Pitche P, Delaporte E, Peeters M. 2011. High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lome, Togo. *J Int AIDS Soc* 14:30.
- El Annaz H, Recordon-Pinson P, Tagajdid R, Doblali T, Belefquih B, Oumakhir S, Sedrati O, Mrani S, Fleury H. 2012. Drug resistance mutations in HIV type 1 isolates from patients failing antiretroviral therapy in Morocco. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:944–948.
- El-Khatib Z, Ekstrom AM, Ledwaba J, Mohapi L, Laher F, Karstaedt A, Charalambous S, Petzold M, Katzenstein D, Morris L. 2010. Viremia and drug resistance among HIV-1 patients on antiretroviral treatment: A cross-sectional study in Soweto, South Africa. *AIDS* 24:1679–1687.
- Hosseinpour MC, Gupta RK, Van Zyl G, Eron JJ, Nachega JB. 2013. Emergence of HIV drug resistance during first- and second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. *J Infect Dis* 207:S49–S56.
- Johannessen A, Naman E, Kivuyo SL, Kasubi MJ, Holberg-Petersen M, Matee MI, Gundersen SG, Bruun JN. 2009. Virological efficacy and emergence of drug resistance in adults on antiretroviral treatment in rural Tanzania. *BMC Infect Dis* 9:108.
- Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer R, Wensing AM, Richman DD. 2011. 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 19:156–164.
- Jordan MR. 2011. Assessments of HIV drug resistance mutations in resource-limited settings. *Clin Infect Dis* 52:1058–1060.
- Kebe M, Fall-Malick FZ, Elghady OI, Ebnou OH, Bara OA, Lam M, Beibacar MO, Diallo MY, Keita M, Sy I, Bellaty AJ, Ly C, LO BB. 2011. Séroprévalence VIH chez les consultants IST à Nouakchott et à Nouadhibou (Mauritanie). *Bull Soc Pathol Exot* 104:374–377.
- Kebe K, Thiam M, Diagne Gueye NR, Diop H, Dia A, Signate Sy H, Charpentier C, Belec L, Mboup S, Toure Kane C. 2013. High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV type 1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:242–249.
- Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeois 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.
- Maiga AI, Fofana DB, Cisse M, Diallo F, Maiga MY, Traore HA, Maiga IA, Sylla A, Fofana D, Taiwo B, Murphy R, Katlama C, Tounkara A, Calvez V, Marcellin AG. 2012. Characterization of HIV-1 antiretroviral drug resistance after second-line treatment failure in Mali, a limited-resources setting. *J Antimicrob Chemother* 67:2943–2948.
- Maiga AI, Fofana DB, Maiga AC, Diallo F, Ait-Arkoub Z, Daou F, Cisse M, Sarro YD, Oumar AA, Sylla A, Katlama C, Taiwo B, Murphy R, Tounkara A, Marcellin AG, Calvez V. 2013. Transmitted antiretroviral drug resistance in newly HIV-infected and untreated patients in Segou and Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:182–186.
- Mamadou S, Hanki Y, Ali Maazou AR, Aoula B, Diallo S. 2011. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 from untreated patients in Niamey, Niger. *ISRN Microbiol* 2011: 797463.
- Messou E, Chaix ML, Gabillard D, Yapo V, Toni TD, Minga A, Kouakou MG, Ouattara E, Rouzioux C, Danel C, Eholie SP, Anglaret X. 2013. Increasing rate of TAMs and etravirine resistance in HIV-1-infected adults between 12 and 24 months of treatment: The VOLTART cohort study in Côte d'Ivoire, West Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 64:211–219.
- Ministère de la Santé-Mauritanie. 2011. Processus d'élaboration du plan de développement Sanitaire (2012–2020). Rapport d'analyse de situation du secteur de la santé. [http://www.international-healthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country\\_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf](http://www.international-healthpartnership.net/fileadmin/uploads/ihp/Documents/Country_Pages/Mauritania/Analyse%20de%20situation%20secteur%20de%20sant%202011%20VF.pdf) [Accessed August 15, 2013].
- Mohamed S, Deris ZZ, Yusoff NK, Ariffin TA, Shueb RH. 2012. Assessing subtypes and drug resistance mutations among HIV-1 infected children who failed antiretroviral therapy in Kelantan, Malaysia. *Braz J Infect Dis* 16:284–288.
- Mumtaz G, Hilmi N, Akala FA, Semini I, Riedner G, Wilson D, Abu-Raddad LJ. 2011. HIV-1 molecular epidemiology evidence and transmission patterns in the Middle East and North Africa. *Sex Transm Infect* 87:101–106.
- Pere H, Charpentier C, Mbelesso P, Dandy M, Matta M, Moussa S, De Dieu Longo J, Gresenguet G, Abraham B, Belec 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.
- Petersen ML, van der Laan MJ, Napravnik S, Eron JJ, Moore RD, Deeks SG. 2008. Long-term consequences of the delay between virologic failure of highly active antiretroviral therapy and regimen modification. *AIDS* 22:2097–2106.
- Revell AD, Wang D, Harrigan R, Hamers RL, Wensing AM, Dewolf F, Nelson M, Geretti AM, Larder BA. 2010. Modelling response to HIV therapy without a genotype: An argument for viral load monitoring in resource-limited settings. *J Antimicrob Chemother* 55:605–607.
- Sigaloff KC, Hamers RL, Wallis CL, Kityo C, Siwale M, Ive P, Botes ME, Mandaliya K, Wellington M, Osibogun A, Stevens WS, van Vugt M, de Wit TF. 2011. Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two arguments for viral load monitoring in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58:23–31.
- Soares EA, Makamche MF, Siqueira JD, Lumngwena E, Mbuagbaw J, Kapteue L, Asonganyi T, Seuanez HN, Soares MA, Alemjji G. 2010. Molecular diversity and polymerase gene genotypes of HIV-1 among treatment-naïve Cameroonian subjects with advanced disease. *J Clin Virol* 48:173–179.
- Sturmer M, Dauer B, Moesch M, Haberl A, Mueller A, Locher L, Knecht G, Hanke N, Doerr HW, Staszewski S. 2007. Evolution of resistance mutations during low-level viral replication in HIV-1-infected patients treated with zidovudine/lamivudine/abacavir as a first-line regimen. *Antivir Ther* 12:25–30.
- 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. 2013. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. *J Clin Microbiol* 51:578–584.
- Tongo M, Martin DP, Zembe L, Mpoudi-Ngole E, Williamson C, Burgers WA. 2013. Characterization of HIV-1 gag and nef in

- Cameroon: Further evidence of extreme diversity at the origin of the HIV-1 group M epidemic. *Virol J* 10:29.
- UNAIDS. 2011. Estimations VIH ET SIDA. <http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/mauritania/> [Accessed August 14, 2013].
- UNAIDS. 2012a. Rapport d'activités sur la réponse sur le VIH/SIDA en Mauritanie. [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) [Accessed August 14, 2013].
- UNAIDS. 2012b. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. [http://www.unaids.org/en/media/unaidsccontentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaidsccontentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf) [Accessed August 14, 2013].
- World Health Organization. 2010. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents-recommendations for a public health approach: 2010 revision. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764_eng.pdf) [Accessed August 28, 2013].
- World Health Organization. 2013. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating, preventing HIV infection recommendations for a public health approach: 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) [Accessed, October12, 2013].

### **III.3.6 Conclusion**

Ce travail a documenté pour la première fois la situation de la résistance aux ARV et la diversité génétique dans le système de santé publique en Mauritanie. Il a montré un taux élevé de mutations de résistance avec prédominance de la M184V, T215Y/F et K103N. Ces résultats corroborent ceux d'autres études menées en Afrique. L'analyse phylogénétique des souches VIH-1 a montré une prédominance du CRF02\_AG comme cela avait été rapporté au Sénégal et dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest. Les résultats obtenus soulignent l'intérêt de la mise en place d'un monitoring virologique structuré (une charge virale par an selon la recommandé par l'OMS en 2013) incluant le test génotypique de résistance si possible et un dispositif d'aide à l'observance pour une meilleure prise en charge des patients sous ARV. La grande variabilité des souches de VIH-1 étudiés nécessite de plus grandes études pour mieux documenter la variabilité génétique au niveau du pays.

La grande diversité génétique du VIH pose un défi pour plusieurs aspects de la prise en charge, en particulier le monitoring virologique. De nombreuses études ont montré que certains variants non B et le CRF02\_AG prédominant en Afrique de l'Ouest sont non ou sous quantifiés par certaines techniques de charge virale (**Swanson P et coll., 2005 ; Wang Y et coll., 2008 ; Gomes P et coll., 2013**). Caractérisé par une grande circulation de variants non B avec prédominance du CRF02\_AG, le Sénégal, n'échappe pas à la grande variabilité du VIH (**Diop-Ndiaye H et coll., 2010 ; Kébé K et coll., 2013**). Pour ce qui est de la Mauritanie, l'échec virologique dans le cadre de notre étude sur la résistance aux ARV qui avait révélé 17 variants du VIH et une prédominance du CRF02\_AG a été documenté grâce à la technologie Cobas TaqMan/Cobas Ampliprep (ROCHE Molecular Diagnostic), qui est la seule plateforme de CV disponible dans le pays. Cependant elle n'a jamais fait l'objet d'une évaluation locale, raison pour laquelle l'évaluation de ses capacités à quantifier les sous-types non B en collaboration avec le Sénégal a fait l'objet de notre 4<sup>ème</sup> travail de comparaison de 4 plateformes de charge.



## **Comparaison des techniques de charge virale du VIH.**

### **III.4 Article N°4 : Quantification de la charge virale des sous types non b : comparaison de 4 techniques commerciales.**

#### **III.4.1 Problématique**

Conformément aux nouvelles recommandations de l'OMS pour le traitement antirétroviral (ART), en plus du taux de CD4 relevé presque à 500 cellules/mm<sup>3</sup> de sang, la charge virale occupe une place importante pour la détection précoce de l'échec virologique dans le but d'évaluer l'efficacité du traitement ARV<sup>64</sup>. Pour cette détermination de la charge virale, plusieurs techniques sont disponibles. Ces dernières ont été optimisées sur la base du sous-type B (**Holguin A et coll., 2008 ; da Silva D et coll., 2010**) qui ne représente qu'environ 10% des souches de VIH dans le monde. De nombreuses études ont montré que certains variants non-B comme le CRF02\_AG prédominant dans les pays de l'Afrique de l'Ouest et le Sénégal sont non ou sous quantifiés par certains techniques de charge virale (**Braun P et coll., 2007 ; Drexler JF et coll., 2007**).

Malgré une faible prévalence du VIH, le Sénégal est caractérisé par une grande diversité génétique, avec la circulation de plusieurs variants du VIH. Le CRF02\_AG représente plus de 60% des souches de VIH dans la population générale (**Geelen S et coll., 2003 ; Diop-Ndiaye H et coll., 2013**) et chez les professionnelles du sexe (**Toure-Kane C et coll., 2000**) tandis que le sous-type C est prédominant dans le groupe d'Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes (HSH) (**Hamel DJ et coll., 2007 ; Leye N et coll., 2013**). Les ARV ont été introduits en 1998 dans le pays (**Laurent C et coll., 2002**) et en 2012, 18 352 patients sont sous traitement hautement actif (HAART).<sup>67</sup> Le pays se lance dans une perspective de décentralisation de la charge virale, d'où la nécessité d'évaluer les capacités des différentes plates-formes disponibles à quantifier les souches de VIH circulants localement.

#### **III.4.2 Objectif**

L'objectif de cette étude était de comparer quatre techniques commerciales de charge virale, Nuclisens EasyQ v2.0® (EQ; Biomerieux), HIV-1 V2.0 COBAS AmpliPreP/COBAS Taqman (CAP-CTM ; Roche), GENERIC HIV Charge Virale Assay (GEN; Biocentric) et Abbott Real Time HIV-1® (m2000sp/rt, Abbott) définie comme la technique de référence.

---

<sup>67</sup> [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) (Consulté, le 07/11/2013).

### **III.4.3 Méthodologie**

#### **Prélèvement des échantillons**

Des prélèvements sur tubes d'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ont été effectués sur des patients du programme national ou de donneurs de sang. La séparation lymphocytaire a été effectuée dans les 4 heures qui suivent le prélèvement et les aliquots de plasmas conservés à -80°C jusqu'à réalisation des tests. La quantification virale pour chaque plate-forme a été effectuée conformément aux instructions du fabricant.

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

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

#### **Technologie Abbott RealTime**

Abbott Real Time HIV-1 assay (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Germany) est un test in vitro d'amplification par RT PCR en temps réel de l'ARN viral ciblant la région de l'intégrase du gène pol hautement conservé grâce à une sonde d'hybridation. L'amplification est couplée à la détection en temps réel utilisant une sonde partiellement double brin marquée. Ce test détecte les VIH -1 groupes M, N, O et P et plusieurs CRF. L'extraction entièrement automatisée a été réalisée sur 600 µl de plasma avec l'automate Abbott m2000sp et l'amplification suivie d'une détection en temps réel avec l'analyseur Abbott m2000rt. Les limites de détection de la technique sont de 1.60 à 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml.

#### **NucliSENS EasyQ HIV technologie**

NucliSENS EasyQ v2.0 (BioMérieux, Lyon, France) effectue une amplification isothermique de l'ARN viral grâce à une balise moléculaire (NASBA) ciblant le gène gag du VIH-1. L'extraction est effectuée sur 200µl de plasma en utilisant l'automate NucliSens EasyMAG. L'amplification NASBA et la détection en temps réel sont effectuées sur l'automate EasyQ. Un contrôle interne est simultanément extrait et amplifié dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test détecte le VIH-1 du groupe M et plusieurs CRF. Les limites de détection de la technique sont de 1.3 à 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml.

### **Technologie Cobas Ampliprep/TaqMan COBAS (CAP-CTM)**

COBAS AmpliPrep/Cobas TaqMan test VIH-1 v2.0 (Roche Molecular Diagnostics, Bale Suisse) permet l'amplification en temps réel par RT-PCR ciblant des régions hautement conservées du gène gag et la région LTR utilisant une sonde TaqMan. COBAS TaqMan utilise un contrôle interne simultanément extrait et amplifié avec chaque échantillon. Ce test détecte les groupes M et O et plusieurs CRF. L'extracteur automatique COBAS Ampliprep a été utilisé pour extraire l'acide nucléique à partir de 1000µl de plasma. L'amplification et détection en temps réel ont été réalisées à l'aide de l'automate COBAS TaqMan 48 avec des limites de détection de 1.3 à 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml.

### **Test BIOCENTRIC**

Le test Generic HIV Charge virale (Biocentric, Brandol, France) utilise le principe de RT-PCR ciblant une région conservée du génome LTR du VIH-1. La détection est faite à l'aide d'une sonde TaqMan. Le test quantifie les groupes M, O et plusieurs CRF. Une extraction manuelle de l'ARN sur colonne à partir de 200µl de plasma a été effectuée avec le kit Qiagen® (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). L'amplification a été réalisée sur ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le Kit Biocentric utilise un étalon externe et les limites de détection de l'essai sont de 2.48 à 7.0 log<sub>10</sub> copies / ml.

### **Génotypage et l'analyse phylogénétique**

Tous les échantillons détectés au-dessus de 3 log par BIOCENTRIC ont été génotypés avec la technique ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>). La totalité du gène de la protéase et les 240 premiers acides aminés du gène de la RT ont été amplifiés par une RT-PCR nichée. Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit (Qiagen, Valencia, Espagne) et séquencés directement sur le séquenceur ABI 3100-Avant en utilisant l'enzyme BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les séquences générées ont été corrigées à l'aide du logiciel SeqMan II™ de DNASTar v.5.08 (Lasergene, Madison) Les alignements et la reconstruction phylogénétique ont été réalisés avec les logiciels Clustal X version 1.83 et Seaview 4.4.1 en utilisant la méthode du plus proche voisin ou Neighbor-Joining (NJ). Tous les sous-types purs et CRF circulant en Afrique de l'Ouest disponibles sur la base de données de Los Alamos ont été inclus dans l'analyse. Pour déterminer si un virus était recombinant ou non, l'analyse de similarité et le bootscanning a été réalisée avec la version 3.5.1 du logiciel Simplot.

## Analyse statistique

Pour la comparaison des valeurs de charge virale il a été appliqué à l'aide du logiciel MethVal : **(i)** le test de corrélation (Pearson) qui consiste à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre deux variables quantitatives à comparer ; **(ii)** le test de concordance (Bland Altman) consistant à apprécier l'écart observé (biais) entre 2 techniques à comparer. Plus 2 techniques sont concordantes, plus le biais est faible et proche de 0. Le coefficient r de Pearson évalue le degré de linéarité de la relation testée, son carré ( $r^2$ ) représentant le pourcentage de variabilité expliquée par le modèle linéaire, plus la valeur du r est proche de 1 plus les 2 techniques sont corrélées. Pour établir des comparaisons, les CV ont été converties en  $\log_{10}$  et une limite de détection fixée en fonction de la (ou des) techniques. Cette limite était fixée à 2.48 log (300 copies) et 1.6 log (40 copies) pour respectivement la comparaison Biocentric/autres techniques et les 3 autres techniques entre-elles. Une différence de CV est considérée significative si elle est  $> 0.5 \log_{10}$ .

### III.4.4 Résultats

#### Analyse des performances d'Abbott RealTime :

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

Pour la répétabilité, les charges virales ont été réalisées en série de 30 aliquots pour chaque niveau de concentration et les coefficients de variation (CV) obtenus étaient de 1.35% [0.44 à 1.37], 0.65% [0.44 à 0.72], 0.54% [de 0.46 à 0.72] pour respectivement les concentrations basses, moyennes et les élevées.

Pour l'évaluation de la reproductibilité, deux panels avec des concentrations faibles et élevées ont été constitués et passés en parallèle dans 30 séries. Les coefficients de variation suivants ont été obtenus : 2.36% [1.34-2.84] et 1.42% [1.32-1.44] pour respectivement les concentrations faibles et élevées.

L'évaluation de la contamination effectuée sur 3 niveaux de concentration disposés consécutivement (faibles-modérées-élevées) et répétés 5 fois a permis de retrouver 0.94% de contamination.

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

### **Comparaison entre Abbott RealTime (m2000sp/rt) et Cobas TaqMan/ Cobas Ampliprep (CAP-CTM)**

Quatre vingt et un (81) échantillons ont été testés sur les deux plateformes. Sur m2000sp/rt, 29 échantillons présentaient des CV indétectables et 52 des CV détectables (moyenne CV = 4.03 log) et sur CAP-CTM 25 échantillons étaient indétectables et 56 détectables (moyenne de CV = 3.86 log). Trois échantillons détectables sur CAP-CTM étaient indétectables sur m2000rt/sp et 3 autres détectables sur m2000sp/rt ne l'étaient pas sur CAP-CTM. Parmi les échantillons détectables sur les 2 plateformes, 3 présentaient des discordances avec 2 et 1 échantillon(s) sous quantifié(s) respectivement par m2000sp/rt et CAP-CTM. Avec une limite de détection fixée à 40 copies/ml, les tests de corrélation et de concordance ont montré entre les deux techniques, une valeur de  $r = 0.98$  et un biais = -0.00185.

### **Comparaison entre Abbott RealTime et Nuclisens EasyQ**

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

### **Comparaison entre Abbott RealTime et Biocentric (GEN)**

Pour comparer ces 2 techniques, 123 échantillons ont été utilisés. Sur Abbott RealTime, 78 avaient des CV indétectables et 45 des CV détectables (moyenne de CV 4.39 log). Sur Biocentric, 67 échantillons étaient indétectables et 56 détectables (moyenne CV = 4.07 log). Quatorze (14) échantillons détectables sur Biocentric étaient indétectables sur Abbott et 3 détectables sur Abbott indétectables sur Biocentric. Sur 59 échantillons détectés par m2000sp/rt et/ou Biocentric, 13 présentaient des discordances avec une CV > 0.5 log. Parmi eux 6 et 7 étaient sous-quantifiés respectivement par m2000sp/rt et Biocentric. La limite de détection entre les deux techniques était fixée à 300 copies/ml et les tests de corrélation et de concordance ont montré entre les deux techniques une valeur de  $r = 0.95$  et un biais = 0.0147.

### **Comparaison Nuclisens et Biocentric**

La comparaison des CV EasyQ et Biocentric a utilisé 73 échantillons. Sur EasyQ 32 échantillons étaient indétectables et 41 détectables (moyenne CV = 4.39 log copies/ml) et sur GEN 19 échantillons étaient indétectables et 54 détectables (moyenne CV = de 4.11 log copies/ml). Un échantillon détecté par EasyQ ne l'était pas par Biocentric et 14 détectés par Biocentric ne l'étaient pas par EasyQ.

Parmi les 54 échantillons avec CV détectable, 20 discordances ont été trouvées avec 6 et 14 sous quantifications par Biocentric et EQ respectivement. Un coefficient de corrélation  $r = 0,90$  et un biais = -0.135 ont été trouvés entre les 2 techniques.

### **Comparaison des Nuclisens et Cobas TaqMan**

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

### **Comparaison des Cobas TaqMan (CAP-CTM) et Biocentric**

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

## Analyse des écarts

La comparaison des charges virales entre les différentes plateformes a permis de répertorier 86 discordances portant sur 37 échantillons : 21 discordances entre EasyQ et CAP-CTM, 20 entre m2000sp/rt et EasyQ, 15 entre EasyQ et GEN, 14 entre CAP-CTM et GEN, 13 entre m2000sp/rt et GEN et 3 entre m2000sp/rt et CAP-CTM. La Plate-forme EasyQ présentait le plus grand écart avec 56 discordances, suivie de Biocentric (42 discordances), CAP-CTM (38 discordances) et m2000sp/rt (36 discordances).

Les 37 échantillons sur lesquels ont porté les discordances présentaient sur la technologie Biocentric une charge virale  $< 3 \log$  pour 10 d'entre-eux et une charge virale  $> 3\log$  pour les 27 restants. Vingt cinq (25) des échantillons à charge virale  $> 3\log$  ont été génotypé et ont montré une prédominance du CRF02\_AG (19/25). Les autres variants retrouvés étaient : C (n= 2), A3 (n=1), D (n=1), CRF01\_AE (n=1) et le CRF49\_cpx (n=1).

Tableau IX : Résultats de charges virales, différences et quantification des variants non B en fonction des 4 plateformes.

Dossier	Charge virale (CV)				Différence de CV						
	M2000	EQ	CAP-CTM	GEN	M2000 vs GEN	M2000 vs CAP-CTM	M2000 vs EQ	EQ vs GEN	EQ vs CAP-CTM	CAP-CTM vs CAP-CTM	Sous type
M1-1017	2,75	2,11	1,73	N D	0,27	1,02	0,64	0,38	-	-	NS
M2-2027	2,14	ND	1,95	ND	-	0,19	0,55	0,36	-	-	NS
M1-1051	2,41	1,81	2,05	2,5	0,03	0,36	0,6	0,24	0,03	0,03	NS
M1-1026	2,8	2,45	2,77	3,1	0,3	0,03	0,36	0,32	0,62	0,33	02_AG
A2-3064	N D	N D	3,11	2,79	0,32	1,52	-	1,52	0,32	0,32	NS
M1-1008	3,16	4	3,28	3,48	0,32	0,12	0,84	0,72	0,52	0,2	02_AG
A1-1006	3,96	3,2	3,78	4,26	0,3	0,19	0,76	0,57	1,06	0,48	02_AG
M2-2049	3,81	4,34	3,95	4,59	0,78	0,13	0,53	0,4	0,25	0,65	NS
M2-2035	3,84	4,73	4,13	4,32	0,49	0,3	0,9	0,6	0,41	0,16	02_AG
A2-1240	3,91	3,62	4,28	3,84	0,5	0,37	0,29	0,66	0,22	0,45	C
M1-1061	4,23	4,34	4,53	4,98	0,76	0,31	0,12	0,19	0,64	0,45	02_AG
M1-1014	4,59	4,53	4,67	4,13	0,47	0,08	0,06	0,14	0,4	0,54	01_AE
M2-2004	4,71	4,45	4,76	5,18	0,47	0,04	0,27	0,31	0,73	0,42	02_AG
M2-2003	4,91	5,4	4,85	4,69	0,23	0,07	0,28	0,55	0,71	0,16	D
M2-2009	4,72	4,63	4,88	5,21	0,49	0,16	0,09	0,25	0,58	0,33	02_AG
A1-1071	5,16	4,57	4,9	5,37	0,21	0,26	0,59	0,33	0,8	0,47	02_AG
M2-2016	4,78	4,4	4,92	5,01	0,23	0,14	0,38	0,52	0,61	0,09	02_AG

NA: non amplifié

ND: non détecté

NS: non séquencé

INV: invalide

Dossier	Charge virale (CV)					DIFFERENCE DE CV							
	M2000	EQ	CAP-CTM	GEN		M2000 vs GEN	M2000 vs CAP-CTM	M2000 vs EQ	EQ vs GEN	EQ vs CAP-CTM	CAP-CTM vs CAP-CTM	Sous type	
M2-2058	5,6	5,52	5,49	6,07		0,47	0,11	0,08	0,03	0,55	0,58	02_AG	
M1-1027	6,2	5,59	5,86	6,54		0,33	0,35	0,61	0,26	0,95	0,68	02_AG	
B1-1155	N D	2,96	N D	2,71		0,23	-	1,37	1,37	0,26	0,23	NS	
A2-1782	ND	INV	ND	2,99		0,51	-	-	-	-	0,51	NS	
M1-1025	3,71	2,61	NA	3,94		0,23	PF	1,1	PF	1,32	PF	02_AG	
97019	3,02	1,88	2,68	2,77		0,25	0,34	1,14	0,29	0,8	0,09	NS	
67033	3,83	3,72	3,67	2,67		1,16	0,16	0,11	1,05	0,05	1	NS	
67162	4,42	3,27	3,97	3,72		0,7	0,45	1,15	0,45	0,7	0,25	02_AG	
1502831	4,7	4,64	4,83	0		2,22	0,13	0,06	2,16	0,19	2,35	49_cpx	
1019301	4,72	4,79	4,89	4,22		0,5	0,17	0,07	0,57	0,1	0,67	C	
1026779	5,17	4,47	4,99	4,64		0,53	0,18	0,7	0,17	0,52	0,35	02_AG	
4007025	5,27	4,39	5,09	4,34		0,93	0,18	0,88	0,05	0,7	0,75	02_AG	
8005126	5,63	6,23	5,34	4,81		0,82	0,29	0,6	1,42	0,89	0,53	02_AG	
6307	5,69	5,3	5,26	5,16		0,53	0,43	0,39	0,14	0,04	0,1	A3	
504152	2,45	ND	2,03	3,01		0,53	0,42	0,86	0,53	0,44	0,53	NS	
8000783	4,77	3,38	4,53	4,49		0,28	0,24	1,39	1,11	1,15	0,04	02_AG	
77415	ND	ND	3,23	ND		-	1,64	-	-	1,64	0,75	NS	

NA: non amplifié

ND: non détecté

NS: non séquencé

INV: invalide

### **III.4.5 Conclusion**

Cette étude a permis de comparer les performances de quatre techniques dans un contexte caractérisé par une grande diversité génétique avec une prédominance du CRF02\_AG. Elle a montré une bonne corrélation entre la technique référence m2000rt/sp et les techniques Nuclisens, EasyQ et CAP-CTM, mais également entre ces 3 dernières techniques. Toutefois, la meilleure corrélation était trouvée entre m2000rt/sp et CAP-CTM et la plus faible entre Nuclisens et Biocentric. Compte tenu de son intérêt pour l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 dans notre contexte, un intérêt particulier a été accordé à la quantification du CRF02\_AG. Comparées aux autres plates-formes, EasyQ et à moindre mesure Biocentric sous quantifiaient le CRF02\_AG, d'où la nécessité d'améliorer la performance de ces deux plateformes pour la quantification de ce variant.

## **Non-B HIV-1 viral load Quantification : comparison of four commercial techniques**

*(en soumission au Journal of Virological Methods)*

### **Background:**

The new WHO guidelines recommend an early antiretroviral treatment initiation (ART) with CD4 count less than 500. Therefore the number of patients fulfilling the criteria to receive a highly active antiretroviral therapy (HAART) will increase [1]. The challenge in resource limited setting will be to maintain patients as long as possible under first line regimen [2]. For this goal, the strong recommendation WHO is to use VL determination as the gold standard for the evaluation of treatment efficacy (with a VL at the lowest possible level) and/or the detection of an earlier virological failure. Indeed, virological failure occurs before the immunological and clinical failure and allows anticipating in therapeutic regimen changes if needed [3]. For this VL determination, several techniques are available and were developed based on subtype B [4-5], which represent around 10% of HIV strains worldwide. Subtype B is found mainly in Europe and northern countries, while non-B subtypes predominate in the world. Numerous studies have shown that certain variants are missed or under quantified by some VL assays such as CRF02\_AG which is predominant in Senegal and other West African countries. [6-9]

Despite its low HIV prevalence, Senegal is characterized by a high genetic diversity with a circulation of many HIV variants. CRF02\_AG represent more than 60% of HIV strains in general population [10-11] and sex workers [12] while subtype C is predominant in the MSM group [13]. The ART was initiated in 1998 and around 17 000 patients were actually under HAART throughout the country. In the perspective of VL monitoring scaling up, there is a need to evaluate locally the different VL platforms according to HIV strains circulating in the country. Therefore, the aim of this study was to compare four commercial techniques, Nuclisens EasyQ v2.0 ® (EQ ; Biomerieux), HIV-1 V2.0 COBAS AmpliPreP/COBAS Taqman (CTM ; Roche), GENERIC HIV CHARGE VIRALE assay (GEN, BIOCENTRIC) and Abbott Real Time HIV-1 ® (*m*2000sp/rt, Abbott) defined as reference technique.

### **Materials and methods**

#### **Sample collection**

Blood samples were collected in Ethylene Diamine Tetra Acetic (EDTA) tubes from patients or blood donors and cells separation was processed to obtain plasma within 4 hours after collection.

Plasma aliquots for each platform were stored frozen (-80 °C) until testing. Viral quantification is performed for each platform according to the manufacturer's instructions.

### **HIV-1 viral load quantification**

Study was performed in two steps: The first was to verify on site HIV Abbott RealTime performances using HIV-1 plasma from blood donor and the second step was to compare VL quantification using three other techniques above mentioned (EQ, GEN, CTM).

### **Abbott RealTime technology**

Abbott RealTime HIV-1 assay (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Germany) is an in vitro qRT-PCR targeting the *integrase* region of the highly conserved *pol* gene. Real time detection uses a partially labeled double-stranded probe. A partial sequence of the pumpkin polymerase gene acts as an internal control and is amplified simultaneously with the sample. This assay detect HIV-1 group M, N, O and P and several CRFs (ref). A fully automatic extraction was performed with the Abbott m2000sp and the amplification followed by real time detection was realized with the Abbott m2000rt. The assay dynamic range is 1.60 to 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml for 600 µL of plasma samples.

### **NucliSens HIV EasyQ technology**

NucliSENS EasyQ v2.0 (BioMerieux, Lyon, France) assay perform isothermal viral ARN amplification thanks to a molecular beacon (NASBA) targeting the HIV-1 *gag* gene. An internal control was simultaneously extracted and amplified by the EasyQ instrument. This assay detect HIV-1 group M and several CRFs. A fully automatic platform was used to extract nucleic acid from 200 µl of plasma using NucliSENS EasyMAG automate followed by NASBA amplification and Real time detection performed on EasyQ automate. The assay dynamic range is 1.3 to 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml for this amount of plasma.

### **COBAS TaqMan technology**

COBAS AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test v2.0 (Roche Molecular Diagnostics, Basel Switzerland) is a qRT-PCR amplifying a conserved region in *gag* gene and *LTR* region using a TaqMan probe. COBAS TaqMan use an internal control simultaneously extracted and amplified with each sample. This assay detect group M, O and several CRFs. The VL determination was performed using the COBAS Ampliprep nucleic acid extractor from 1000 µl of plasma and the amplification and real time detection were realized using COBAS TaqMan 48. The assay dynamic range is 1.3 to 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml for this amount of plasma.

## **BIOCENTRIC assay**

Generic HIV-1 Charge Virale (BIOCENTRIC, Brandol, France) is a qRT-PCR targeting a conserved region of *LTR* in HIV genome and VL was determined using a TaqMan probe. This assay detect group M, O and several CRFs. A manual RNA extraction was perfomed using with Qiagen spin column (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) form 200 µl of plasma. Amplification was performed on ABI PRISM 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). Biocentric kit uses a external standard and the assay dynamic range is 2.48 to 7.0 log<sub>10</sub> copies/ml for this amount of plasma.

## **Genotyping and phylogenetic analysis**

Any samples detected above 3.0 log by BIOCENTRIC was genotyped with the HIV French drug resistance technique (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Briefly, the entire protease gene and a fragment encoding the 240 first amino acid of RT gene were amplified by a nested RT-PCR. PCR products were purified (Qiagen, Valencia, Spain) and directly sequenced on ABI 3100-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).

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 was included in the analysis. To determine whether the viruses were recombinant or not, similarity analysis and bootscanning 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.

## **Abbott Performances evaluation and statistical analysis**

Performances of Abbott RealTime technology were evaluated by testing the repeatability using 3 levels of concentration from plasma blood donor. For reproducibility, the values of high and low positive controls from the same batch of Abbott kit were collected within 30 runs. Coefficients of variation (CV), accuracy and uncertainties for both were calculated and were compared to manufacturer's CV values for contamination.

For VL quantification platform comparison, correlation and concordance tests were determined between Abbott RealTime and the others with the MethVal software.

## **Results:**

### **Performance analysis of Abbott RealTime:**

Abbott RealTime performance was assessed using repeatability, reproducibility, incertitude, accuracy and contamination.

For repeatability, VL were performed in series with 30 aliquots for each concentration level and the coefficients of variation (CV) obtained were 1.35% [0.44-1.37], 0.65% [0.44-0.72], 0.54% [0.46-0.72] for low, intermediate and high concentrations respectively.

For reproducibility, VL were tested on two panels with low and high concentration on 30 series and showed the following CV values : 2.36% [1.34-2.84] and 1.42% [1.32-1.44], for low and high concentration levels respectively.

Accuracy and Incertitude were evaluated from the results of reproducibility on two panels (low and high concentration). For Accuracy, the following values were obtained: 1.02% for the low concentration and 0.20% for the high concentration. And incertitude obtained were: 0.14 for low concentration and 0.14 for high concentration.

Contamination evaluation was performed using three concentrations levels arranged consecutively (low - moderate - high) and repeated 5 times. This evaluation method was allowed to obtain 0.94%.

## **Comparison of viral load results:**

### **Comparison between Abbott RealTime and Cobas Taqman:**

To compare VL between *m2000sp/rt* and CTM, 81 samples were tested on both platforms. With *m2000sp/rt*, 29 samples had undetectable VL and 52 had detectable VL with a mean VL of 4.03 log. With CTM, 25 samples had undetectable VL and 56 samples had detectable VL with a mean VL of 3.86 log. Three samples were detectable on CTM and undetectable on *m2000sp/rt* and three other samples were detectable on *m2000sp/rt* and undetectable on CTM but all detectable VL was below 2 log copies/ml. Among the 59 samples detected by *m2000sp/rt* and/or CTM, 3 discrepancies were observed; among them two samples detected around 3 log copies/ml by CTM were under quantified and below the detection limit of Abbott technology. The last sample detected at 2.75 log copies/ml by *m2000sp/rt* was under quantified by CTM. Pearson's correlation showed a good correlation between the two techniques with  $r^2 = 0.98$  and mean difference of -0.00185.

### **Comparison between Abbott RealTime and Nuclisens:**

Comparison of VL between *m2000sp/rt* and Nuclisens was performed on 73 samples. With *m2000sp/rt* platform, VL was undetectable on 22 samples and detected on 51 samples with a mean VL of 4.09 log copies/ml. With EQ platform, VL was undetectable on 27 samples and detected on 46 with a mean VL of 4.10 log copies/ml. One sample was detectable by EQ and undetectable by *m2000sp/rt* and 6 samples were detectable by *m2000sp/rt* and undetectable by EQ but all samples were below 2.96 log copies/ml. Among the 52 samples detected by *m2000sp/rt* and/or EQ, 20 had discrepancies VL ranged from 2 to 6 log copies/ml with 5 and 15 samples under quantified by *m2000sp/rt* and EQ respectively. A good correlation was found between *m2000sp/rt* and EQ with  $r^2 = 0.96$  and mean difference of -0.144.

### **Comparison between Abbott RealTime and BIOCENTRIC:**

For VL comparison between *m2000sp/rt* and GEN, 123 samples were tested on both platforms. With Abbott RealTime, 78 samples presented undetectable VL and 45 samples were detected with a mean VL of 4.39 log. With GEN platform, 67 samples were undetectable and 56 samples were detected with a mean VL of 4.07 log copies/ml. Considering the threshold detection of GEN which is 2.48 log copies/ml as the one for the comparison, 14 samples were detected by GEN and not detected by *m2000sp/rt* and three samples were detected by *m2000sp/rt* and not detected by GEN.

Among the 59 samples detected by *m2000sp/rt* and/or GEN, 13 presented discrepancies with VL > 0.5 log including 6 samples under quantified by *m2000sp/rt* (with 2 below the detection limit) and 7 samples under quantified by GEN. Comparison of VL quantification between *m2000sp/rt* and GEN showed a good correlation with  $r^2 = 0.96$  and a bias of -0.144.

### **Comparison Nuclisens and Biocentric:**

Comparison of VL between EQ and GEN was performed on 73 samples. Samples tested by EQ showed 32 undetectable and 41 detectable with a mean VL of 4.39 log copies/ml. Samples tested by GEN showed 19 undetectable and 54 detectable with a mean VL of 4.11 log copies/ml. One sample was detectable by EQ and undetectable by BIOCENTRIC and 14 had detectable VL by GEN and were undetectable by EQ. Among 54 samples with detectable VL, 20 discrepancies were found with 6 under quantified by GEN and 14 under quantified by EQ. Comparison of VL quantification between EQ and GEN showed a coefficient of correlation of  $r^2 = 0.90$  and a mean difference of -0.135.

### **Comparison of Nuclisens and Cobas:**

To compare the viral loads between EQ and CTM, 72 samples were tested on both platforms. Samples tested by EQ showed 27 samples with undetectable VL and 45 were detectable with a mean VL of 4.17 log copies/ml. Samples tested by CTM showed 19 undetectable and 52 detected with a mean VL of 3.94 log copies/ml. One sample was detectable by EQ and undetectable by CTM and 9 samples were only detected by CTM. Among 54 samples with VL detectable, 17 presented discrepancies with 5 under quantified by CTM and 12 under quantified by EQ. Comparison of VL quantification between EQ and CTM showed a good correlation  $r^2 = 0.95$  and a bias of - 0.122.

### **Comparison of Cobas and Biocentric:**

Comparing the viral loads between CTM and GEN, 81 samples were tested on both platforms. With CTM platform, 38 samples were undetectable and 43 were detectable with a mean VL of 4.42 log copies/ml. With GEN platform, 26 samples had undetectable VL and 55 samples were detectable with a mean VL of 4.08 log copies/ml.

Two samples were detectable only on CTM and 13 samples were detectable only GEN. Among 57 samples with detectable VL, 14 samples presented discrepancies with 7 under quantified by CTM (with 2 below the detection limit) and 7 other under quantified by GEN (with 2 below the detection limit). Comparison of VL quantification between CTM and GEN showed for correlation  $r^2 = 0.94$  and a biais of -0.0512.

### **Analysis of discrepancies**

VL comparison showed 86 discrepancies between different platforms as follows: 21 between EQ and CTM, 20 between *m2000sp/rt* and EQ, 15 between EQ and GEN, 14 between CTM and GEN 13 between *m2000sp/rt* and GEN and 3 between Abbott and CTM which presented the best reproducibility. EQ platform also has a number of discrepancies with other techniques more important with 56 discrepancies, GEN with 42 discrepancies, CTM with 38 and *m2000sp/rt* with 36 discrepancies.

All discrepancies repertories concerned 37 samples (table 1) and 10 present less than 3 log with BIOCENTRIC technology and 27 had more than 3 log. Out of 27 samples with VL > 3 log, genotyping was performed on 25 samples and the distributing was as followed: 19 were CRF02\_AG, 2 were subtype C, 1 was A3, 1 subtype D, 1 CRF01\_AE and 1 CRF49\_cpx.

**Table 1:**

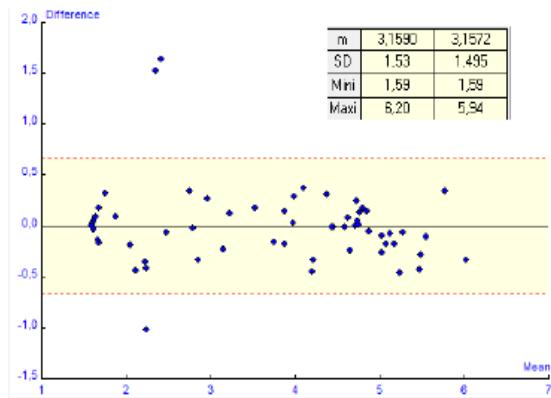
Dossier	VIRAL LOAD				VL DIFFERENCE						Sub type
	M2000	EQ	CTM	GEN	M2000 vs GEN	M2000 vs CTM	M2000 vs EQ	EQ vs GEN	EQ vs CTM	CTM vs CTM	
M1-1017	2,75	2,11	1,73	N D	0,27	1,02	0,64	0,38	-	-	NS
M2-2027	2,14	ND	1,95	ND	-	0,19	0,55	0,36	-	-	NS
M1-1051	2,41	1,81	2,05	2,50	0,03	0,36	0,60	0,24	0,03	0,03	NS
M1-1026	2,80	2,45	2,77	3,10	0,30	0,03	0,36	0,32	0,62	0,33	02_AG
A2-3064	N D	N D	3,11	2,79	0,32	1,52	-	1,52	0,32	0,32	NS
M1-1008	3,16	4,00	3,28	3,48	0,32	0,12	0,84	0,72	0,52	0,20	02_AG
A1-1006	3,96	3,20	3,78	4,26	0,30	0,19	0,76	0,57	1,06	0,48	02_AG
M2-2049	3,81	4,34	3,95	4,59	0,78	0,13	0,53	0,40	0,25	0,65	NS
M2-2035	3,84	4,73	4,13	4,32	0,49	0,30	0,90	0,60	0,41	0,16	02_AG
A2-1240	3,91	3,62	4,28	3,84	0,50	0,37	0,29	0,66	0,22	0,45	C
M1-1061	4,23	4,34	4,53	4,98	0,76	0,31	0,12	0,19	0,64	0,45	02_AG
M1-1014	4,59	4,53	4,67	4,13	0,47	0,08	0,06	0,14	0,40	0,54	01_AE
M2-2004	4,71	4,45	4,76	5,18	0,47	0,04	0,27	0,31	0,73	0,42	02_AG
M2-2003	4,91	5,40	4,85	4,69	0,23	0,07	0,28	0,55	0,71	0,16	D
M2-2009	4,72	4,63	4,88	5,21	0,49	0,16	0,09	0,25	0,58	0,33	02_AG
A1-1071	5,16	4,57	4,90	5,37	0,21	0,26	0,59	0,33	0,80	0,47	02_AG
M2-2016	4,78	4,40	4,92	5,01	0,23	0,14	0,38	0,52	0,61	0,09	02_AG
M1-1068	5,47	4,70	5,01	5,74	0,27	0,47	0,77	0,31	1,04	0,73	02_AG
M2-2008	5,16	5,58	5,08	5,75	0,59	0,08	0,42	0,50	0,17	0,67	02_AG
M1-1037	5,31	4,40	5,24	5,67	0,36	0,08	0,91	0,84	1,27	0,44	02_AG
M2-2058	5,60	5,52	5,49	6,07	0,47	0,11	0,08	0,03	0,55	0,58	02_AG
M1-1027	6,20	5,59	5,86	6,54	0,33	0,35	0,61	0,26	0,95	0,68	02_AG
B1-1155	N D	2,96	N D	2,71	0,23	-	1,37	1,37	0,26	0,23	NS
A2-1782	ND	INV	ND	2,99	0,51	-	-	-	-	0,51	NS
M1-1025	3,71	2,61	NA	3,94	0,23	PF	1,10	PF	1,32	PF	02_AG
97019	3,02	1,88	2,68	2,77	0,25	0,34	1,14	0,29	0,8	0,09	NS
67033	3,83	3,72	3,67	2,67	1,16	0,16	0,11	1,05	0,05	1,00	NS
67162	4,42	3,27	3,97	3,72	0,70	0,45	1,15	0,45	0,7	0,25	02_AG
1502831	4,7	4,64	4,83	0,00	2,22	0,13	0,06	2,16	0,19	2,35	49_cpx
1019301	4,72	4,79	4,89	4,22	0,50	0,17	0,07	0,57	0,1	0,67	C
1026779	5,17	4,47	4,99	4,64	0,53	0,18	0,7	0,17	0,52	0,35	02_AG
4007025	5,27	4,39	5,09	4,34	0,93	0,18	0,88	0,05	0,7	0,75	02_AG
8005126	5,63	6,23	5,34	4,81	0,82	0,29	0,6	1,42	0,89	0,53	02_AG
6307	5,69	5,3	5,26	5,16	0,53	0,43	0,39	0,14	0,04	0,10	A3
504152	2,45	ND	2,03	3,01	0,53	0,42	0,86	0,53	0,44	0,53	NS
8000783	4,77	3,38	4,53	4,49	0,28	0,24	1,39	1,11	1,15	0,04	02_AG
77415	ND	ND	3,23	ND	-	1,64	-	-	1,64	0,75	NS

NA: not amplified

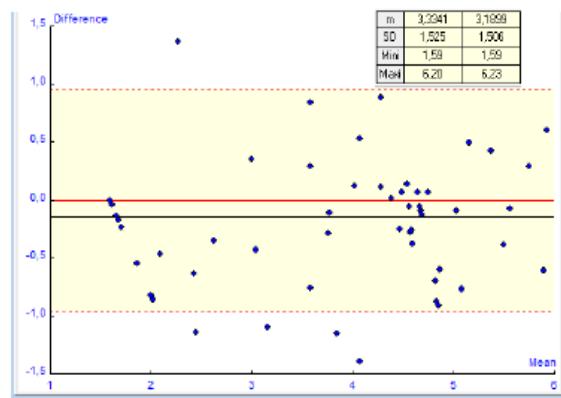
ND: not detected

NS: not sequencing

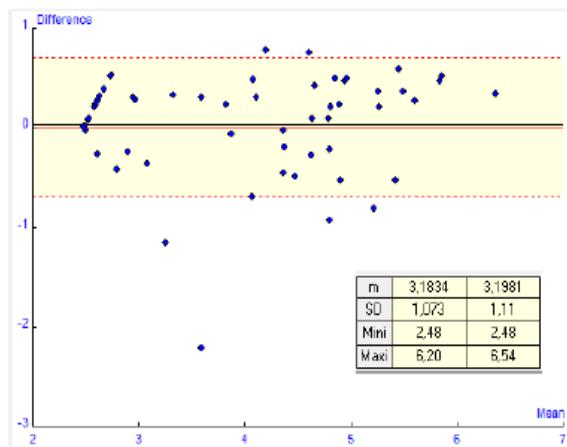
INV: invalid



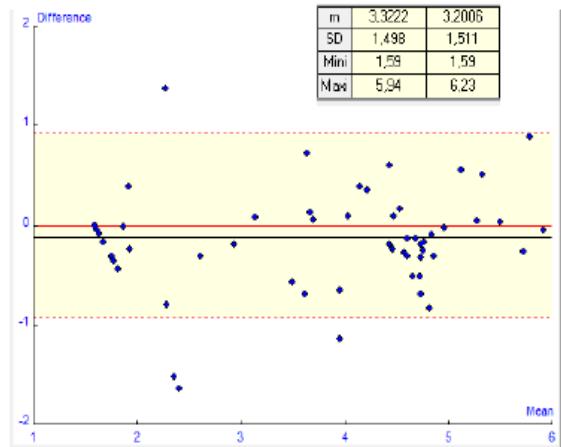
ABBOTT VS CTM Bias -0.00185



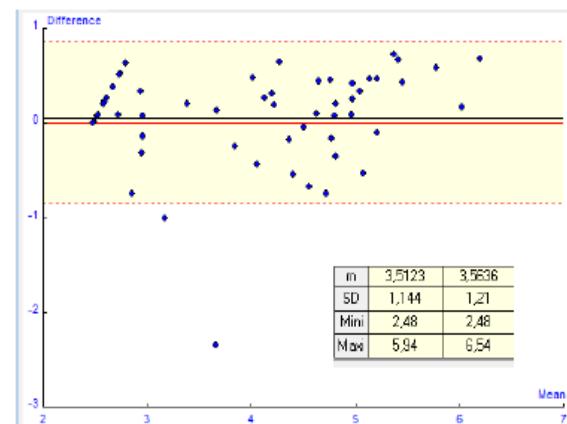
ABBOTT VS EQ Bias -0.144



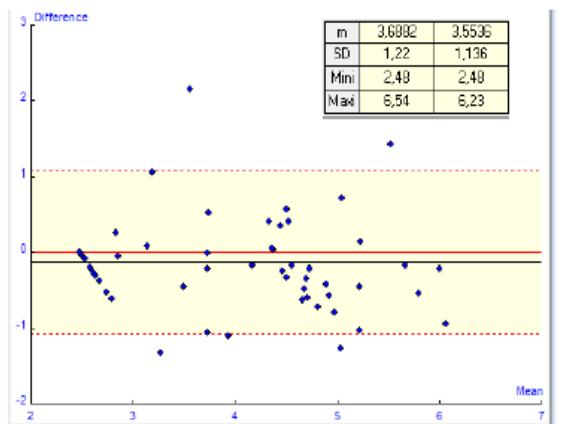
ABBOTT VS GEN Bias= 0.0147



CTM – EQ (n=72) Bias -0.122



CTM – GEN (n=81) Bias -0.0512



GEN – EQ (n=73) Bias -0.13

## **Discussion**

In the context of resource-limited setting, VL is a strong recommendation by WHO for monitoring patients under ART. VL is a marker predicting the risk of disease progression [15]. Only VL is able to confirm the HAART success and to detect earlier virological failure which is the entry point to second line regimen [16]. So, VL is crucial for the monitoring of patients under ART and a rational use of ARVs at programmatic level.

In Senegal, several techniques are available for patients VL monitoring. However, with the high genetic diversity it becomes important to evaluate these VL techniques according to the main strains circulating in the country.

This study aimed to compare the performance of four techniques for a potential switch between different platforms in the context of resource-limited setting characterized by the problems of regular procurement.

Abbott technology was used as the reference method in this study because it is routinely performed in our laboratory and is on regular external quality control. Performances verification of this technique was acceptable compared to other studies [17].

The comparison of VL quantification techniques showed high correlation and good agreement between Abbott and three other techniques as well as these last techniques between them. The best value of correlations ( $r^2 = 0.98$ ) and agreement (bias = -0.00185 (-0.0761 to 0.0726)) is found between *m2000sp/rt* vs CTM and confirm those obtained in other studies [17-18]. A low rate of false negative results (3/81 for each platform) and under quantified VL (2/81 by Abbott and 1/81 by CTM) is found between Abbott and CTM, and these discrepancies is related to samples with low or undetectable VL as reported in other studies[18-19]. For Church et al the not-detection of samples by the two techniques could be related to primer and probe mismatches in both *pol-int* and *gag* target regions [19]. Bourlet et al found that CTM v2.0 presented a positive bias (0.33) over Abbott and suppose that the over quantification could be due to probably the modification of amplification step and viral load calculation [18].

The comparison of VL between *m2000sp/rt* and EQ have also showed a high correlation ( $r = 0.96$ ) and a relatively good agreement (bias = -0.144 (-0.256 to 0.0326)). However, a high number of false negative results (1/73 on *m2000sp/rt* and 6/73 on EQ) and samples under quantified (5/73 *m2000sp/rt* and 15/73 EQ) was noted between the two platforms. Similar results were found between CTM and EQ ( $r^2 = 0.95$  and bias = -0.122) with a high number of false negatives (1/72 on CTM and 9/72 on EQ) and samples under quantified (5/72 by CTM and 12/72 by EQ) by EQ.

The lowest value of correlation was found between platforms EQ and GEN ( $r^2 = 0.90$  and a bias = -0.130). EQ have more samples false negatives (14/73) and under quantified samples (14/73) than GEN with 1/73 sample false negative and 6/73 samples under quantified.

Among the four platforms VL studied, EQ presented the more number of false negative samples and under quantified samples. The similar data were reported by Church et al between Realtime HIV-1, COBAS TaqMan Easy Q v1.2 and Versant v3.0 for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. They also found more false negative results (18/25; 72%) and under quantification results (32/41; 78%) with EQ and bDNA for patients with non-B subtype infections. The lower correlation with the other platforms maybe due to a combination of instability in the method (i.e., molecular beacon approach) as well as mismatches the probe and primers and the gag target region, particularly [19]. The other study by Bourlet et al. compared four commercial Real-Time assays showed that Nuclisens HIV EasyQ v1.2 assay was the least favorable, exhibiting significantly lower viral loads and wider discrepancies [18].

The comparison between the reference technique *m*2000sp/rt and GEN had found a high correlation value ( $r^2 = 0.95$ ) and a good agreement (bias = 0.0147). However, Abbott has more false negative (14 /123) than BIOCENTRIC generic kit (3/123). Both platforms have sensibility the same numbers of samples under quantified with 6 samples under quantified by Abbott and 7 samples under quantified by BIOCENTRIC.

The comparison between CTM platform and GEN has showed results comparable with those obtained in the comparison between GEN and *m*2000sp/rt with a correlation value with  $r^2 = 0.94$  and a good agreement with bias = -0.0512. As the reference method, CTM has more false negative results (13/81) than the BIOCENTRIC generic kit (2/81) and both platforms have the same number of samples under quantified with 7 samples.

The number of samples under quantified between BIOCENTRIC and *m*2000sp/rt or CTM is sensibility similar. However, the high number of false negative found in Abbott and CTM could be the false positive and justify the relative high detection limit of BIOCENTRIC platform (2.48 log copies/ml).

Samples with viral loads more than 3 Log had been genotyping. Twenty five (25) genotyping were performed and CRF02\_AG were predominant with 19/25.

Some studies reported difficulties of EQ platform to quantify the non-B subtypes including C, A1, AG, G and CRF02\_AG [2, 20, 21].

Given his interest in the molecular epidemiology of HIV-1 in our context we are interested to the quantification of CRF02\_AG by EQ platform. We found that compared with other platforms, EQ under quantified for 16/19 samples. Among the samples under quantified by EQ, 2 samples had under quantified compared to three other platforms, 4 samples had under quantified compared to Abbott and CTM, 4 other samples compared to Abbott and BIOCENTRIC, 1 sample under quantified compared to CTM and BIOCENTRIC and 5 samples under quantified compared to BIOCENTRIC. We also found that 3/19 CRF02\_AG samples were over quantified by EQ. Among them, 2/3 and 1/3 were under quantified by other platforms and Abbott and CTM respectively. These results confirm previously studies of EQ to quantify non-B subtype particularly the CRF02\_AG. Another study by Rouet et al. in 2010 compared generic HIV viral load assay (BIOCENTRIC) with CTM HIV-1 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantification of non-B subtypes. The generic kit BIOCENTRIC detected 9/160 strains that are not detected by CTM (n=7) or EasyQ (n=2) [22].

This study compared the techniques of viral load quantification found a good correlation between the reference technique and other techniques, but also past each other. However the best value-correlate was found between Abbott Vs Cobas and the lowest value between Nuclisens Vs BioCentric. The study also showed that compared to other techniques, EQ under quantified CRF-02\_AG main variant isolated in our context. Therefore, efforts to improve the perforation of the art with respect to the quantification of non-B strains, in particular the CFR02\_AG are required.

## Reference

1. **Whord Health Organization.** 2013 Consolidated guidelines on use of antiretroviral drugs for treating, preventing HIV infection recommendations for public health approach: 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf). [Accessed November, 20 2013]
2. **Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Brun-Vézinet F, Clotet B, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, Pillay D, Yeni PG, Jacobsen DM, Richman DD; International AIDS Society-USA.** 2008. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Top HIV Med.* 16 (3):266-85.
3. **Da Silva D, Van Wesenbeeck L, Breilh D, Reigadas S, Anies G, Van Baelen K, Morlat P, Neau D, Dupon M, Wittkop L, Fleury H, Masquelier B.** 2010. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. *J Antimicrob Chemother.* 65(6):1262-9.
4. **Holguín A, López M, Molinero M, Soriano V.** 2008. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol.* 46 (9):2918-23.
5. **Braun, P., R. Ehret, F. Wiesmann, F. Zabbai, M. Knickmann, R. Kuhn, S. Thamm, G. Warnat, and H. Knechten.** 2007. Comparison of four commercial quantitative HIV-1 assays for viral load monitoring in clinical daily routine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45:93–99.
6. **Swanson P, Mendoza C, Joshi Y, Golden A, Hodinka R L, Soriano V, Devare S G, and Hackett J.** 2005. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genetic Diversity on Performance of Four Commercial Viral Load Assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *Journal of Clinical Microbiology.* 43(8) 3860–3868.
7. **Y Wang, A Song, S Xu, X Li, H Chong, C Zhao, J Nie, and C Zhang.** 2008. Impact of HIV-1 Genetic Diversity in China on the Measurement of Viral Load. *J. Med. Virol.* 80:1-8.
8. **Drexler, J. F., L. K. de Souza Luna, C. Pedroso, D. B. Pedral-Sampaio, A. T. Queiroz, C. Brites, E. M. Netto, and C. Drosten.** 2007. Rates of and reasons for failure of commercial human immunodeficiency virus type 1 viral load assays in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 45:2061-2203.
9. **Geelen, S., J. Lange, J. Borleffs, T. Wolfs, A. Weersink, and R. Schuurman.** 2003. Failure to detect a non-B HIV-1 subtype by the HIV-1 Amplicor monitor test, version 1.5: a case of unexpected vertical transmission. *AIDS.* 17:781-782.
10. **Diop-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.
11. **Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, 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.
12. **Hamel D. J, Sankalé J-L, Eisen G, Meloni S.T, Mullins C, Gueye-Ndiaye A, Mboup S and Kanki P J.** 2007. Twenty Years of Prospective Molecular Epidemiology in Senegal: Changes in HIV Diversity. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 23 (10) : 1189-96
13. **Diop-Ndiaye H, Touré-Kane C, Vidal N, Niang-Diallo PA, Niama RF, Dièye T, Gaye-Diallo A, Wade AS, Peeters M and 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(2):249-52

14. 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.
15. Yilmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. 2001. *J Clin Virol.* 21(3):187-96.
16. Bekker, L. G., L. Myer, C. Orrell, S. Lawn, and R. Wood. 2006. Rapid scale-up of a community-based HIV treatment service: programme performance over 3 consecutive years in Guguletu, South Africa. *S. Afr. Med. J.* 96:315–320.
17. Scott LE, Noble LD, Moloi J, Erasmus L, Venter WD, Stevens W. 2009. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 assays. *J Clin Microbiol.* 47(7):2209-17.
18. Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Trabaud MA, Tardy JC, Morand P, Pozzetto B, Ecochard R, André P. 2011. HIV-1 load comparison using four commercial real-time assays. *J Clin Microbiol.* 49(1):292-7.
19. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, Gill MJ. 2011. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J Clin Microbiol.* 49(1):118-24.
20. Korenromp EL, Williams BG, Schmid GP, Dye C. 2009. Clinical prognostic value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection--a quantitative review. *PLoS One.* 4(6):e5950.
21. Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA. 1996. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med.* 2(6):625-9.
22. 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. 2010. Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *J Virol Methods.* 163(2):253-7.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

- L'épidémiologie du VIH/SIDA en Mauritanie est très peu documentée. C'est pour répondre à cette préoccupation que les 4 thématiques suivantes ont été abordées dans le cadre de cette thèse :
- la surveillance sentinelles chez les femmes en consultation prénatale (CPN) de 2001 à 2007,
- la surveillance seconde génération (sérologique et socio-comportementale) chez les consultants pour Infection Sexuellement Transmissibles (IST),
- les profils de mutations de résistance et la diversité génétique chez les patients mauritaniens suivis au sein de la cohorte nationale de santé publique
- la comparaison de 4 techniques de charge virale : m2000sp/rt (Abbott), COBAS AmpliPreP/COBAS Taqman HIV-1 V2.0 (Roche), GENERIC HIV CHARGE VIRALE Assay (BIOCENTRIC) et Nuclisens EasyQ v2.0 (Biomerieux) utilisées dans notre contexte local.

Les résultats de la surveillance épidémiologique sont utiles pour suivre les épidémies, juger de l'efficacité de la réponse nationale et éclairer les décisions de programmes (**Pisani E et coll., 2003**). Ainsi, la documentation du VIH/SIDA au sein de la population générale, des groupes spécifiques et au niveau des personnes vivant avec le VIH à travers plusieurs aspects est incontournable pour une bonne gestion et un contrôle épidémique. Le système de suivi de l'épidémie à VIH/SIDA en Mauritanie portait sur les donneurs de sang jusqu'en 2000.<sup>68</sup> Même si ce système peut donner certaines indications sur le VIH/SIDA, en lien avec certains biais de sélection du groupe, les résultats issus du dépistage des donneurs de sang doivent être interprétés avec prudence et sont plus utiles à des fins de sensibilisation. En effet les donneurs ayant un comportement à vulnérabilité élevé ont tendance à s'abstenir de donner leur sang. Ce fait associé à une dynamique de fidélisation des donneurs pourrait influencer la nature des résultats recueillis et leur utilisation à des fins d'estimation de la prévalence nationale. Tout cela a joué un rôle de pulsion pour la réalisation de la première enquête d'envergure chez les femmes en consultation prénatale (CPN) en 2001.

Menée sur un échantillon représentatif, l'enquête a ciblé toutes les régions du pays et sur la base de ses résultats, un réseau national structuré de sites de surveillance sentinelles a été mis en place en 2003.

---

<sup>68</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) (Consulté le 15/07/2013).

De périodicité biennale, cette surveillance souscrit aux recommandations de l'OMS et porte sur les femmes âgées de 15 à 49 ans fréquentant les centres de santé offrant des activités de CPN. Dans ce type d'enquête où l'accent doit être mis sur les jeunes femmes de moins de 25 ans pour une estimation indirecte des infections récentes, les coûts de surveillance sont minimisés.<sup>69</sup>

Notre travail sur la sérosurveillance des femmes en CPN nous a permis d'apprécier la qualité des données générées et d'avoir une idée sur l'évolution de la prévalence sur 7 années de surveillance régulière. Sur la période d'étude, le recrutement des femmes enceintes avait montré une amélioration perceptible. De 2393 femmes en 2003, on est passé à partir de 2005 à des échantillons d'une taille supérieure à 5000.<sup>70</sup>

Pour l'année 2003, 4 sites importants dont 2 des régions de l'Est (Néma et Aïoun) proches des frontières maliennes, 1 (Kaédi) de la région du fleuve frontalière avec le Sénégal et 1(Teyarett) à Nouakchott la capitale n'avaient pas fourni une taille d'échantillon suffisante. En 2007, ce sont 3 sites dont 1 toujours au niveau de la région de l'Est (Néma) et 2 du Nord (Atar et Akjoujt) qui présentaient la même situation. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette situation : manque de sensibilisation et/ou de motivation des responsables et personnel impliqués, mobilité des ressources humaines, problème d'accessibilité financière au bilan prénatal, population cible réduite (site d'Akjoujt), supervision et suivi par le niveau central irréguliers.

Les résultats sérologiques montraient une disparité de la prévalence entre les différents sites pour une même année. De même, en fonction de l'année, un même site montrait une prévalence fluctuante. Cependant, cette dernière était statistiquement non significative. On peut citer l'exemple de Kaédy qui avait montré une prévalence de 0.35% [0-1.04] en 2001, 1.15% [0.30-2.00] en 2005 et 0.31% [0-0.74] en 2007.

Ces résultats étaient à l'image de ceux observés au niveau des autres pays de la sous-région comme le Sénégal.<sup>71</sup>

<sup>69</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 15/07/2013).

<sup>70</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) (Consulté le 20/12/2013).

<sup>71</sup> <http://www.cnls-senegal.org/pdf/BulletinEpidémiologique11.pdf> (Consulté le 11/09/2013).

En considérant toute la période de notre étude, de façon globale c'est au niveau des sites situés au Sud (Rosso, Sélibaby, Kaédy), à l'Est (Kiffa), et au niveau des 2 grandes villes du pays, Nouakchott et Nouadhibou que les prévalences les plus élevées étaient observées. Néanmoins, quel que soit l'année, les prévalences les plus élevées se situaient toujours au niveau de Nouadhibou et Nouakchott. Ceci étant, la prévalence moyenne de Nouakchott était toujours plus basse ou proche de la prévalence moyenne nationale. Elle était de 0.33% versus 0.57 % au niveau national et de 0.62 % versus 0.61% respectivement en 2001 et 2007.

Alors que les données de séroprévalence du VIH chez les femmes en zones rurales sont importantes et servent dans la définition des types d'épidémies locales, les sites ne couvraient pas le milieu rural.<sup>72</sup> Par ailleurs, même si la fiche de collecte spécifiait le milieu de résidence permanent des femmes recrutées (urbain ou rural), cette information était inexploitée. De ce fait la prévalence du VIH chez les femmes en milieu rural ne ressortait pas dans les données de surveillance sentinelle.

Les enquêtes sérologiques d'incidence exigent des échantillons de grande taille et un suivi de longue durée mobilisant des ressources humaines et financières importantes. Au lieu de mesurer l'incidence, l'OMS recommande de suivre les tendances de la séroprévalence du VIH chez les femmes jeunes d'âge inférieure à 25 ans, à travers un nombre limité de sites sentinelles à forte fréquentation.<sup>73</sup> Les seules données de prévalence en fonction de l'âge n'étaient disponibles que pour l'année 2005. Elles ne montraient de différence statistiquement significative que pour le site de Sebkha ( $p\text{-value} = 0.04 < 0.05$ ) avec une prévalence plus élevée (2.2%) au sein des femmes de 15-24 ans contre une prévalence de 1.2% chez les femmes de 25 ans et plus. Du fait de la supposition que les femmes de moins de 25 ans aient une activité sexuelle récente, la proportion de nouvelles infections a plus de chance d'être plus élevée parmi elles que parmi les femmes plus âgées.<sup>71</sup> Grâce aux recommandations découlant de ce travail, les données sur les femmes de moins de 25 ans ont été intégrées et pris en compte dans les données de surveillance sentinelle chez les femmes en CPN à partir de 2009 (données non publiées).

Notre travail a montré pour un intervalle de confiance de 95%, une prévalence annuelle relativement basse (inférieure à 1%) avec une évolution stable, statistiquement non significative [ $p\text{-value} = 0.396$ ] sur la période d'étude (de 2001 à 2007). Elle était respectivement de 0.57% et 0.83% en 2001 et 2003 et de 0.8% et 0.61% en 2005 et 2007.

<sup>72</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 20/12/2013).

<sup>73</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/guidelinesforconduction_fr.pdf) (Consulté le 20/09/2013).

Le VIH-1 était prédominant sur notre période d'étude avec une proportion de 94% en 2007. Les faiblesses de notre travail étaient le manque de prise en compte des femmes en milieu rural et des femmes jeunes de moins de 25 ans.

La comparaison des données obtenues avec ceux de plusieurs pays voisins et autres pays de l'Afrique sub-saharienne a montré que la prévalence chez les femmes en CPN en Mauritanie était plus élevée qu'au niveau du Maroc et de l'Algérie au Maghreb (**Elharti E et coll., 2002 ; Aidaoui M et coll., 2008**) mais restait plus basse que celles des pays de l'Afrique de l'Ouest et du centre. Ces derniers caractérisés par une prévalence dépassant 3% pour la plupart d'entre eux. Elles étaient de 1.7% en 2004 au Sénégal et de 3.6% en 2005 pour le Mali. De grands écarts de prévalence étaient observés entre les pays de l'Afrique de l'Est présentant une prévalence moyenne de 4-5% et de l'Australe avec des prévalences de l'ordre de 29% et 32% en 2006 respectivement pour l'Afrique du Sud et le Botswana.<sup>74</sup>

Combinées aux données d'autres sources (programmes PTME, ARV...), les données de surveillance sentinelle servent à estimer la prévalence nationale du VIH et à faire des projections sur l'infection et les cas de SIDA. Par ailleurs, même si les résultats de surveillance sentinelle ne permettent pas une extrapolation à la population générale et ne peuvent être appliqués qu'aux populations et sites concernés, les données d'enquêtes chez les femmes enceintes en CPN sont en général très proches des résultats d'enquêtes menées auprès de la population générale. Il est également admis que dans un contexte d'épidémie non généralisé, la prévalence parmi les femmes enceintes est un bon indicateur de la prévalence au sein de la population générale.<sup>75</sup> Enfin, il est supposé que les femmes en CPN présentent des risques au VIH similaires à ceux des femmes issues de la population générale. De ce fait, intégrées dans la surveillance, elles pourraient donner une idée sur l'infection chez les femmes de la population générale (**Mmbaga EJ et coll., 2009**). Cependant, les données de prévalence chez les femmes en CPN n'informent pas sur les comportements qui exposent à l'infection, les sous populations les plus vulnérables ou les groupes « passerelles » vecteur de transmission et de diffusion du VIH de la population vulnérable à la population générale.<sup>76</sup> Ceci a motivé l'orientation vers la surveillance combinée sérologique et comportementale plus en mesure d'identifier les sous groupes de populations les plus exposés au VIH et d'expliquer les comportements, attitudes et pratiques sous-jacents à des taux de prévalence élevés de l'infection.<sup>77</sup>

<sup>74</sup> [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_fr.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_fr.pdf) (Consulté le 19/09/2013).

<sup>75</sup> [http://www.policyproject.com/policycircle/documents/epp\\_manf.pdf](http://www.policyproject.com/policycircle/documents/epp_manf.pdf) (Consulté le 19/12/2013).

<sup>76</sup> [http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration\\_fr.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration_fr.pdf) (Consulté le 27/07/2013).

<sup>77</sup> [http://www.policyproject.com/policycircle/documents/epp\\_manf.pdf](http://www.policyproject.com/policycircle/documents/epp_manf.pdf) (Consulté le 27/07/2013).

C'est ainsi qu'après notre travail sur le suivi de l'épidémie du VIH chez les femmes en CPN en Mauritanie sur la période de 2001 à 2007, nous nous sommes intéressés à la surveillance combinée (sérologique et socio-comportementale) également appelée surveillance de seconde génération chez les consultants pour infections sexuellement transmissibles (IST), groupe supposé vulnérable vis-à-vis du VIH.

Présentant les mêmes modes de transmission que le VIH, les IST augmenteraient la probabilité de transmission du virus (**Ng BE et coll., 2011**). Par ailleurs, il a été clairement démontré une forte association entre les IST ulcérantes et non ulcérantes et l'infection par le VIH, d'où la conclusion que le contrôle des IST peut contribuer à la prévention du VIH (**Wilkinson D et Rutherford G, 2001**).

Les résultats de notre travail sur la sérologie du VIH, la syphilis et des connaissances, comportements, attitudes et pratiques des consultants pour IST face aux VIH/SIDA à Nouakchott et Nouadhibou avait porté sur 224 consultants pour IST recrutés selon l'approche syndromique. La ration H/F était de 1.0 avec une moyenne d'âge de 35 ans. Après administration du questionnaire 210 patients ont accepté d'être prélevés soit un taux d'acceptation de 94%. Le taux d'acceptation était plus élevé que celui (90%) rapporté par une étude combinée menée au Sénégal auprès d'un groupe à caractéristiques de la population générale (**Gueye Ndiaye A et coll., 2009**). Les patients étaient relativement jeunes avec un âge maximal de 40 ans (78% ; n=164) et étaient à 70.5% (n=148) mariés et n'avaient pas dépassé pour la plupart le niveau primaire (81.4% ; n=171).

Les symptômes d'IST les plus cités par les enquêtés étaient les mictions douloureuses, les ulcérations/plaies génitales et les douleurs abdominales basses et ceux les plus retrouvés (30.5%) dans le cadre de notre travail, étaient les douleurs abdominales basses et les douleurs mictionnelles.

Le rôle de la fidélité à un partenaire stable séronégatif pour la protection contre le VIH semblait être bien connu par les enquêtés (97.3%). Par ailleurs, les 4/5 des enquêtés connaissaient le rôle préventif du préservatif contre les IST et le VIH. Cependant, 21% parmi ces derniers les 3/4 entretiendraient des relations avec un partenaire extra-conjugal régulier sans utilisation du préservatif. Beaucoup de fausses croyances tel que le choix d'un partenaire qui paraît en bonne santé pour se prévenir du VIH/SIDA ont été citées par les enquêtés. Ces fausses croyances étaient associées à des attitudes qui exposent aux IST et VIH avec seulement la moitié des enquêtés déclarant informer leur partenaire sur le portage d'une IST parmi lesquels environ un cinquième reconnaissant avoir des partenaires occasionnels dont 3/4 n'utilisant pas de préservatifs.

Les principales raisons avancées pour la non utilisation du préservatif étaient qu'il réduit le plaisir (41.7%) ou l'oubli (25%). Une étude menée au Botswana au sein de l'armée sur un échantillon de 211 hommes d'âge maximum de 30 ans avait retrouvé en plus du même motif principal (réduction du plaisir sexuel) à la non utilisation du préservatif retrouvé dans le cadre de notre travail, une consommation excessive d'alcool ou la confiance à la partenaire sexuelle (**Tran BR et coll., 2013**).

La séroprévalence de l'infection par le VIH était de 9 % et celle de la syphilis de 10%. A côté des hommes qui ont des relations sexuelles avec d'autres hommes, les professionnelles du sexe constituent un groupe très vulnérable au VIH avec des prévalences généralement très nettement supérieures à celles de tous les autres groupes spécifiques, y compris les consultants pour IST (**Kane CT et coll., 2009 ; Mooij SH et coll., 2013**). Sans différence significative [**p=0.49 ; > 0.05**], la séroprévalence de notre population d'étude (9%) était plus élevée que celle retrouvée (7.4%) chez les Professionnelles du Sexe dans le cadre d'une étude similaire conduite dans le pays sur la même période<sup>78</sup>.

Malgré un échantillon d'étude limité, la forte séroprévalence (9%) et les comportements attitudes et pratiques décrits dans le cadre de ce travail permettent de confirmer la haute vulnérabilité vis-à vis du VIH/SIDA des consultants pour IST fréquentant les 3 sites de notre étude.

Les résultats sur la surveillance du VIH chez les femmes en consultation prénatale et les consultants pour IST ont permis de suivre l'évolution de l'épidémie au sein des sites sentinelles de surveillance, d'estimer la prévalence au niveau national et de définir le type d'épidémie locale. Cependant, ils ne sont pas suffisants pour bien cerner la problématique du VIH/SIDA et sa meilleure prise en charge. Pour répondre à ce souci, nous avons entrepris dans le cadre de notre 3<sup>ème</sup> thématique de travail de thèse, une étude sur les profils de mutations de résistance aux ARV et la diversité génétique chez les patients mauritaniens traités pour infection par le VIH-1 suivis selon la démarche de santé publique au Centre de traitement Ambulatoire de Nouakchott.

Les données issues de notre travail sur 86 patients suspectés d'échec virologique et présentant une charge virale  $\geq 3 \log_{10}$  copies/ml nous a permis d'apprécier dans le cadre d'une étude transversale l'efficacité des schémas thérapeutiques de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> lignes chez les patients traités de la cohorte nationale de santé publique et les profils de résistance aux antirétroviraux ARV.

---

<sup>78</sup> [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_MR\\_Narrative\\_Report%5B1%5D.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MR_Narrative_Report%5B1%5D.pdf) (Consulté le 14/11/2013).

Cette étude a montré un taux élevé (72.30%) de mutations de résistance aux ARV après une médiane de suivi de 32 mois. Des résultats similaires ont été trouvés après une médiane de suivi de 40 mois dans les pays utilisant les même schémas thérapeutiques de première ligne contenant 2 INNTI et 1NNTI, comme le Sénégal (**Thiam M et coll., 2013**) et d'autres pays à ressources limitées (**El-Khatib Z et coll., 2010 ; Péré H et coll., 2012**). Pour les premières lignes de traitements, la Stavudine était le principal inhibiteur nucléosidique de la reverse transcriptase (INRT) et le tiers des patients étaient sous Triomune fixe dose, comme c'est les cas de la plupart des pays à faibles ressources (**Dagnra AY et coll., 2011 ; Messou E et coll., 2013**) avant la recommandation de l'OMS 2010 de remplacement de la D4T<sup>79</sup>.

Pour les patients sous régimes de première ligne, les mutations les plus fréquentes étaient la M184V et T215Y (TAM) pour les INRT et la K103N et Y181C pour les INNRT. Ces résultats corroborent ceux observés au Sénégal et dans d'autres pays africains (**E-Khatib Z et coll., 2010 ; Chaplin B et coll., 2011 ; Thiam M et coll., 2013**).

En absence de suivi virologique, la réPLICATION virale en présence d'un traitement devenue inefficace est associée à une accumulation progressive de mutations de résistance (**Stürmer M et coll., 2007**). Cette accumulation de mutations de résistance peut compromettre l'efficacité des traitements de deuxième ligne (**Petersen ML et coll., 2008; Sigaloff KCE et coll., 2011 ; Hosseinpour et coll., 2013**). L'association entre la durée du traitement et l'accumulation de mutations de résistance a été étudiée dans le cadre de ce travail et n'a montré de différence significative que pour la M184V. Le fait que cette dernière ne soit pas trouvée pour les TAM, pourrait probablement être lié à la taille limitée de l'échantillon.

Pour ce qui est des besoins en traitements de relais, globalement, 12 patients sous première ligne et 2 sous deuxième ligne présentaient des mutations de résistance nécessitant des médicaments antirétroviraux qui ne sont pas disponibles dans le pays et dans de nombreux pays à ressources limitées compromettant ainsi l'avenir thérapeutique des patients.

---

<sup>79</sup> <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/index.html> (Consulté le 12/06/2013).

A l'instar des autres pays à faible ressources, le nombre de molécules ARV et les possibilités de mise sous traitement de deuxième ligne sont très limités, alors que les 3<sup>ème</sup> lignes sont indisponibles dans la plupart de ces pays (**Thiam M et coll., 2013**), d'où la nécessité de fournir des efforts pour préserver pour une durée maximale l'efficacité des traitements de première ligne. C'est ainsi que l'OMS a développé (2012) à côté des enquêtes de surveillance de la résistance transmises conduites auprès de sujets neufs récemment infectées par le VIH, 3 stratégies supplémentaires: la surveillance de la résistance aux ARV chez les enfants de moins de 18 mois, chez les patients initiant leur traitement ARV et la surveillance de la résistance acquise chez les patients sous ARV après 12 et 24 mois de traitement<sup>80</sup>.

Cette étude transversale a donné également une idée sur la diversité génétique des souches de VIH-1 qui circulent en Mauritanie avec une prédominance du CRF02\_AG (64.6%) et une grande diversité génétique montrant 17 sous-types/CRF dont 10 recombinants uniques malgré un contexte de prévalence nationale du VIH faible.<sup>81</sup> Cette prédominance du CRF02\_AG a été décrite dans de nombreux autres pays d'Afrique de l'Ouest et dans la région ouest de l'Afrique centrale (**Mamadou S et coll., 2011 ; Kébé K et coll., 2013 ; Maiga AI et coll., 2013 ; Tongo M et coll., 2013**). En revanche, une seule souche du sous-type B a été identifié alors qu'il est le principal variant circulant dans les pays voisins du Nord au Maghreb (**Mumtaz G et coll., 2011, El annaz H et coll., 2012**).

Ce travail malgré le nombre limité d'échantillons, (faiblesse de notre étude), a documenté pour la première fois, la situation de la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux et la diversité génétique au niveau du système national de santé publique en Mauritanie.

Dans les pays à ressources limitées où 90% des nouvelles infections se produisent, avec le passage à l'échelle des ARV, la charge virale est fortement recommandé par l'OMS pour évaluer l'efficacité du traitement antirétroviral<sup>82</sup>. Ces techniques de charge virale développées sur la base des sous type B et utilisées dans les pays à faibles ressources où les sous-types non B prédominent (**Holguin A et coll., 2008**) nécessitent des études comparatives pour la détermination de leurs sensibilité et capacité à quantifier la CV de ces variants, en particulier le CRF02\_AG dominant en Afrique de l'Ouest (**Hemelaar J et coll., 2012 ; Peeters M et coll., 2013**).

<sup>80</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 13/11/2012).

<sup>81</sup> <http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/mauritania/> (Consulté le 27/07/2013).

<sup>82</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 09/11/2013).

Le Sénégal est caractérisé par une grande diversité génétique avec la circulation de variants non B et une prédominance du CRF02\_AG (**Diop-Ndiaye H et coll., 2010 ; Diouara AA et coll., 2013 ; Kébé K et coll., 2013**). A l'instar des autres pays à faibles ressources, plusieurs techniques de CV développées à partir du sous-type B sont utilisées dans le pays (Sénégal) pour le suivi des patients sous ARV alors qu'en Mauritanie, une seule plateforme de charge virale, (Cobas TaqMan/Cobas Ampliprep (CAP-CTM, ROCHE)) est disponible. Utilisée pour le suivi des patients sous traitement ARV, elle a servi à documenter l'échec virologique de notre étude sur les profils de mutation de résistance aux ARV en Mauritanie, qui a montré une grande diversité génétique des sous-types non B avec prédominance du CRF02\_AG. Malgré cela, l'évaluation préalable de la capacité de la technique à quantifier les sous-types non B avant son utilisation locale, n'avait jamais fait l'objet d'une étude, d'où notre 4<sup>ème</sup> travail entrepris en collaboration avec le Sénégal pour comparer les capacités des plateformes (Nuclisens EasyQ v2.0® (EQ, Biomerieux), HIV-1 V2.0 CobasAmpliPreP/CobasTaqman (CAP-CTM, Roche), Generic HIV Charge Virale (Generic, Biocentric) et Abbott Real Time HIV-1® (m2000sp/rt, Abbott) à quantifier les sous-types non-B.

Nos résultats sur la comparaison des 4 plateformes de quantification de la CV ont montré une forte corrélation entre Abbott et les 3 techniques (CAP-CTM, Biocentric et EasyQ), mais également entre ces trois dernières. Ceci étant, la meilleure corrélation ( $r^2 = 0,98$ ) et concordance (biais = -0,00185) étaient trouvées entre m2000rt/sp (Abbott) et CAP-CTM (Roche). Ces résultats confirment ceux obtenus dans le cadre d'autres études (**Scott LE et coll., 2009 ; Bourlet T et coll., 2011**). La plus faible valeur de corrélation a été trouvée entre les plates-formes EQ et Biocentric ( $r^2 = 0,90$ , biais = -0.130). Des 4 plateformes, EasyQ présentait également le plus grand nombre d'échantillons faux négatifs et d'échantillons sous quantifiés. Des données similaires avaient été rapportées par une étude comparant cette technique (EasyQ v2.0), la technique CobasTaqMan et la v3.0 de Versant (**Church D et coll., 2011**). A l'opposée, une autre étude comparant cette même technique à m2000rt pour la quantification des sous-types G et CRF02 AG avait montré avec des différences de CV non significatives (de l'ordre de 0.3 log) des valeurs de charge virale moyenne plus élevé avec m2000 rt qu'avec EasyQ v2.0 (**Gomes P et coll., 2013**).

Vingt cinq (25) échantillons présentant une charge virale  $> 3\log$  avaient fait l'objet d'un génotypage qui avait montré une prédominance du CRF02\_AG ( $n=19$  ; 76%). Vu son importance épidémiologique dans notre contexte, nous nous sommes intéressé à la quantification de ce variant. Les plateformes EQ et Biocentric comparées aux autres techniques ont sous-quantifié respectivement 16/19 et 6/19 échantillons de CRF02\_AG. Ces résultats corroborent ceux d'autres études précédemment menées qui avaient montré la difficulté de la plateforme EQ à quantifier les sous-types non-B (**Hirsch MS et coll., 2008, Korenromp EL et coll., 2009**).

Notre travail comparant les techniques de quantification de la charge virale a trouvé une bonne corrélation entre la technique de référence et les autres techniques. Toutefois, la meilleure corrélation a été trouvée entre m2000rt et Cobas et la plus faible entre Nuclisens et Biocentric.

L'étude a également montré que comparées aux autres techniques, EasyQ et à moindre mesure Biocentric sous-quantifiaient le CRF- 02\_AG, principal variant isolé dans notre contexte. Par conséquent, son utilisation locale, nécessite des efforts d'amélioration de sa performance par rapport à la quantification des souches non-B, en particulier le CRF02\_AG. Les bons résultats de comparaison entre les 2 techniques m2000rt/sp et CAP-CTM nous réconforment sur son utilisation en Mauritanie pour le diagnostic précoce de l'échec virologique et le suivi des patients sous traitement ARV.

## **CONCLUSION GENERALE**

## **CONCLUSION GENERALE**

Les travaux menés dans le cadre cette thèse ont eu comme but de contribuer à la bonne documentation de la situation du VIH/SIDA en Mauritanie.

Le travail portant sur la surveillance sentinelle chez les femmes en consultation prénatale a permis d'apprécier l'évolution de la prévalence sur 7 années de surveillance sentinelle (2001-2007). Il avait montré une prévalence moyenne inférieure à 1% avec évolution stable sur la période d'étude. Malgré des insuffisances relevées, les données de surveillance sentinelle en Mauritanie en plus de leur utilité dans le suivi de l'évolution de la prévalence du VIH chez les femmes en CPN ont permis d'accélérer l'initiative nationale d'accès aux ARV.

Notre travail sur la surveillance seconde génération chez les consultants pour infections sexuellement transmissibles a permis d'estimer la prévalence au sein du groupe et de documenter leurs connaissances, comportement, attitudes et pratiques face au VIH/SIDA. Les séroprévalences élevées de l'infection par le VIH (9 %) et de la syphilis de 10 % et les Comportements Attitudes et Pratiques retrouvés dénote d'une mauvaise prise de conscience de la problématique du VIH/SIDA par le groupe étudié. Même si l'échantillon d'étude était limité, ce travail a permis d'estimer la prévalence du VIH au sein du groupe après plusieurs années d'absence de données à leur niveau, mais surtout de documenter pour la première fois, leurs connaissances, comportements, attitudes et pratiques face au VIH/SIDA.

Les données de la surveillance sentinelle et celles de surveillance de seconde génération issues de nos deux premiers travaux de thèse ont contribué à mieux documenter celles de la surveillance épidémiologique en Mauritanie et d'accélérer l'initiative nationale d'accès aux ARV. Par ailleurs, en absence d'une enquête nationale EDS+, ils ont également permis une estimation plus précise de la prévalence nationale et la catégorisation du type d'épidémie local. Ces données sur l'épidémiologie générale ont été complétées par celles sur l'épidémiologie moléculaire et l'étude des mutations de résistance.

Les résultats sur les profils de mutations de résistance et l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 chez les patients de la cohorte nationale suivis dans le système de santé publique ont montré un taux de résistance aux ARV élevé (72.3%) après une médiane de suivi de 32 mois. Les mutations de résistance les plus fréquentes étaient la M184V/I, la K103N et la T215Y. Ces résultats corroborent ceux d'autres études menées en Afrique. Parmi les MDR retrouvées, une association entre la durée du traitement et l'accumulation de mutations a été trouvée avec une différence significative pour la M184V [ $p = 0.035$ ].

L'analyse des mutations de résistance pour la prédiction du schéma thérapeutique a mis l'accent sur la nécessité de disposer de plus de molécules de première et deuxième lignes, mais également sur l'importance de l'accès aux 3èmes lignes de traitement. L'analyse phylogénétique des souches VIH-1 a montré une grande diversité génétique et une prédominance du CRF02\_AG.

Malgré l'échantillon d'étude limité, les résultats de ce travail ont documenté pour la première fois la situation de la résistance aux ARV et la diversité génétique en Mauritanie. Cette grande diversité impose l'évaluation des performances de toutes les technologies de diagnostic et de suivi comme la charge par rapport aux souches locales circulantes.

Le 4ème objectif dans le cadre de cette thèse a été d'évaluer les performances de 4 techniques de CV, y compris celle disponible en Mauritanie (CAP-CTM). Il a montré une bonne corrélation entre la technique de référence (m2000 rt/sp et les 3 autres techniques avec une meilleure corrélation et concordance entre la technique référence et CAP-CTM. L'étude a par ailleurs mis en évidence des problèmes de sous-quantification du CRF-02\_AG par EQ et à moindre mesure par Biocentric, d'où la conclusion que l'utilisation locale de ces techniques, nécessite des efforts d'amélioration de leur performance pour la quantification des sous types non B, en particulier le CRF02\_AG. Les bons résultats de comparaison entre les 2 techniques m2000rt/sp et CAP-CTM rassurent sur son utilisation en Mauritanie dans le suivi des patients sous ARV.

Les travaux menés à travers les 4 objectifs de cette thèse amènent à faire ces recommandations :

- mettre en place un système de surveillance épidémiologique régulier intégrant, milieu rural et groupes clés et associant à la sérologie les comportements, pour mieux cerner les causes d'éventuelles disparités entre différents sites géographiques et groupes,
- mettre en place le diagnostic précoce chez les nouveaux-nés de mère séropositives et un suivi virologique structuré de la cohorte nationale avec une quantification de la charge virale une fois par an selon les recommandations de l'OMS 2013<sup>83</sup> et intégrer à ce dernier si possible, le test génotypique de résistance. Pour être efficace, il est nécessaire d'associer à ce suivi, un dispositif d'aide à l'observance.

---

<sup>83</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf) (Consulté le 05/09/2013).

## PERSPECTIVES

Malgré les 4 axes contribuant à la connaissance de l'épidémie du VIH et au bon suivi de patients sous traitement antirétroviral en Mauritanie développés dans le cadre de cette thèse, nombreux aspects restent à explorer pour une meilleure documentation de la situation locale du VIH/SIDA en Mauritanie. C'est ainsi que plusieurs perspectives se dégagent de ces travaux de thèse :

- reconduire une nouvelle enquête combinée chez les consultants pour IST pour affiner les résultats de séroprévalence du VIH et CCAP trouvés dans le cadre de notre étude etc.,
- mener une plus large étude pour confirmer les profils de mutation de résistance et la diversité génétique retrouvés dans le cadre de nos travaux,
- mettre en place un système de surveillance de la résistance transmise,
- Mener une étude de validation de la technologie Cobas Ampliprep/ Cobas Taqman 48 disponible au niveau de l'INRSP à partir de souches de VIH-1 locales.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adamson CS. 2012. Protease-Mediated Maturation of Hiv: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Mol Biol Int* 2012: 604261.
2. Aghokeng AF, Kouanfack C, Eymard-Duvernay S, Butel C, Edoul GE, Laurent C, Koulla-Shiro S, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Peeters M. 2013. Virological Outcome and Patterns of Hiv-1 Drug Resistance in Patients with 36 Months' Antiretroviral Therapy Experience in Cameroon. *J Int AIDS Soc* 16: 18004.
3. Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, 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(4): 1635-41.
4. Aidaoui M, Bouzbid S, Laouar M. 2008. Séroprévalence De L'infection Vih Chez Les Femmes Enceintes Dans La Région De Annaba (Algérie). *Rev Epidemiol Sante Publique*. 56(4): 261-66.
5. Aitken SC, Bronze M, Wallis CL, Stuyver L, Steegen K, Balinda S, Kityo C, Stevens W, Rinke de Wit TF, Schuurman R. 2013. A Pragmatic Approach to Hiv-1 Drug Resistance Determination in Resource-Limited Settings by Use of a Novel Genotyping Assay Targeting the Reverse Transcriptase-Encoding Region Only. *J Clin Microbiol* 51(6): 1757-61.
6. Ala PJ, Huston EE, Klabe RM, Jadhav PK, Lam PY, Chang CH. 1998. Counteracting Hiv-1 Protease Drug Resistance: Structural Analysis of Mutant Proteases Complexed with Xv638 and Sd146, Cyclic Urea Amides with Broad Specificities. *Biochemistry* 37(43): 15042-9.
7. Alexander L, Zhang S, McAuliffe B, Connors D, Zhou N, Wang T, Agler M, Kadow J, Lin PF. 2009. Inhibition of Envelope-Mediated Cd4+-T-Cell Depletion by Human Immunodeficiency Virus Attachment Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 53(11): 4726-32.
8. Alfadhli A, Still A, Barklis E. 2009. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Binding to Membranes and Nucleic Acids. *J Virol* 83(23): 12196-203.
9. Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal Mdel C, Garcia F. 2012. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of Hiv Infection. *Open Virol J* 6: 135-43.
10. Amadou A, Kouka N, Mahamane AE, Chanteau S. 2005. Evaluation De Cinq Tests Rapides Et De Deux Algorithmes Pour Le Diagnostic De L'infection Par Le Vih Au Niger. *Bull Soc Pathol Exot* 98(1): 5-8.
11. Ammaranond P, Sanguansittanan S. 2012. Mechanism of Hiv Antiretroviral Drugs Progress toward Drug Resistance. *Fundam Clin Pharmacol* 26(1): 146-61.
12. Andersen ES, Contera SA, Knudsen B, Damgaard CK, Besenbacher F, Kjems J. 2004. Role of the Trans-Activation Response Element in Dimerization of Hiv-1 Rna. *J Biol Chem* 279(21): 22243-9.
13. Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V. 2008. Hiv-1 Vpr: Mechanisms of G2 Arrest and Apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85(1): 2-10.
14. Anderson JP, Rodrigo AG, Learn GH, Madan A, Delahunty C, Coon M, Girard M, Osmanov S, Hood L, Mullins JI. 2000. Testing the Hypothesis of a Recombinant Origin of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E. *J Virol* 74(22): 10752-65.
15. Anta L, Llibre JM, Poveda E, Blanco JL, Alvarez M, Perez-Elias MJ, Aguilera A, Caballero E, Soriano V, de Mendoza C. 2013. Rilpivirine Resistance Mutations in Hiv Patients Failing Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based Therapies. *AIDS* 27(1): 81-5.
16. Antinori A, Trotta MP, Lorenzini P, Torti C, Gianotti N, Maggiolo F, Ceccherini-Silberstein F, Nasto P, Castagna A, De Luca A, Mussini C, Andreoni M, Perno CF. 2007. Virological Response to Salvage Therapy in Hiv-Infected Persons Carrying the Reverse Transcriptase K65 Mutation. *Antivir Ther* 12(8): 1175-83.
17. Apolloni A, Hooker CW, Mak J, Harrich D. 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Regulation of Tat Activity Is Essential for Efficient Reverse Transcription and Replication. *J Virol* 77(18): 9912-21.
18. Apolloni A, Meredith LW, Suhrbier A, Kiernan R, Harrich D. 2007. The Hiv-1 Tat Protein Stimulates Reverse Transcription in Vitro. *Curr HIV Res* 5(5): 473-83.

19. **Archer J, Weber J, Henry K, Winner D, Gibson R, Lee L, Paxinos E, Arts EJ, Robertson DL, Mimms L, Quinones-Mateu ME.** 2012. Use of Four Next-Generation Sequencing Platforms to Determine Hiv-1 Coreceptor Tropism. *PLoS One* 7(11): e49602.
20. **Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W.** 2003. Patterns of Point Mutations Associated with Antiretroviral Drug Treatment Failure in Crf01\_Ae (Subtype E) Infection Differ from Subtype B Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(3): 336-42.
21. **Armenia D, Vandebroucke I, Fabeni L, Van Marck H, Cento V, D'Arrigo R, Van Wesenbeeck L, Scopelliti F, Micheli V, Bruzzone B, Lo Caputo S, Aerssens J, Rizzardini G, Tozzi V, Narciso P, Antinori A, Stuyver L, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F.** 2012. Study of Genotypic and Phenotypic Hiv-1 Dynamics of Integrase Mutations During Raltegravir Treatment: A Refined Analysis by Ultra-Deep 454 Pyrosequencing. *J Infect Dis* 205(4): 557-67.
22. **Arrildt KT, Joseph SB, Swanstrom R.** 2012. The Hiv-1 Env Protein: A Coat of Many Colors. *Curr HIV/AIDS Rep* 9(1): 52-63.
23. **Arthur LO, Bess JW, Jr., Sowder RC, 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE.** 1992. Cellular Proteins Bound to Immunodeficiency Viruses: Implications for Pathogenesis and Vaccines. *Science* 258(5090): 1935-8.
24. **Asahchop EL, Oliveira M, Wainberg MA, Brenner BG, Moisi D, Toni T, Tremblay CL.** 2011. Characterization of the E138k Resistance Mutation in Hiv-1 Reverse Transcriptase Conferring Susceptibility to Etravirine in B and Non-B Hiv-1 Subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 55(2): 600-7.
25. **Ashish GR, Anguita J, Krueger J.** 2006. Binding of Full-Length Hiv-1 Gp120 to Cd4 Induces Structural Reorientation around the Gp120 Core. *Biophys J.* 91(6): L69-71.
26. **Ataher Q, Portsmouth S, Napolitano LA, Eng S, Greenacre A, Kambugu A, Wood R, Badal-Faesen S, Tressler R.** 2012. The Epidemiology and Clinical Correlates of Hiv-1 Co-Receptor Tropism in Non-Subtype B Infections from India, Uganda and South Africa. *J Int AIDS Soc* 15(1): 2.
27. **Auewarakul P, Wacharapornin P, Srichatrapimuk S, Chutipongtanate S, Puthavathana P.** 2005. Uncoating of Hiv-1 Requires Cellular Activation. *Virology* 337(1): 93-101.
28. **Aulicino PC, Gomez-Carrillo M, Bello G, Rocco C, Mangano A, Carr J, Sen L, Foley B.** 2012. Characterization of Full-Length Hiv-1 Crf17\_Bf Genomes and Comparison to the Prototype Crf12\_Bf Strains. *Infect Genet Evol* 12(2): 443-7.
29. **Ayouba A, Akoua-Koffi C, Calvignac-Spencer S, Esteban A, Locatelli S, Li H, Li Y, Hahn BH, Delaporte E, Leendertz FH, Peeters M.** 2013. Evidence for Continuing Cross-Species Transmission of Sivsmm to Humans: Characterization of a New Hiv-2 Lineage in Rural Cote d'Ivoire. *AIDS* 27(15): 2488-91.
30. **Ayouba A, Maclere P, Martin PM, Cunin P, Mfoupouendoun J, Njinku B, Souquieres S, Simon F.** 2001. Hiv-1 Group O Infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg Infect Dis* 7(3): 466-7.
31. **Ayouba A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Maclere P, Simon F, Nerrienet E.** 2000. Hiv-1 Group N among Hiv-1-Seropositive Individuals in Cameroon. *AIDS* 14(16): 2623-5.
32. **Azevedo-Pereira JM, Santos-Costa Q, Moniz-Pereira J.** 2005. Hiv-2 Infection and Chemokine Receptors Usage - Clues to Reduced Virulence of Hiv-2. *Curr HIV Res* 3(1): 3-16.
33. **Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Bethune MP, Kraus G, Boven K, Jochmans D, Van Craenenbroeck E, Picchio G, Rimsky LT.** 2010. Tmc278, a Next-Generation Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (Nnrti), Active against Wild-Type and Nnrti-Resistant Hiv-1. *Antimicrob Agents Chemother* 54(2): 718-27.
34. **Bachelier L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, Cordova B, Hertogs K, Lader B, Buckery 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(11): 4999-5008.
35. **Bachu M, Mukthey AB, Murali RV, Cheedarla N, Mahadevan A, Shankar SK, Satish KS, Kundu TK, Ranga U.** 2012. Sequence Insertions in the Hiv Type 1 Subtype C Viral Promoter Predominantly Generate an Additional Nf-Kappab Binding Site. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(10): 1362-8.

36. **Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, Mandaliya K, Jaoko W, Overbaugh J.** 2007. Hiv-1 Subtype D Infection Is Associated with Faster Disease Progression Than Subtype a in Spite of Similar Plasma Hiv-1 Loads. *J Infect Dis* 195(8): 1177-80.
37. **Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, Tappero JW, Bukusi EA, Cohen CR, Katabira E, Ronald A, Tumwesigye E, Were E, Fife KH, Kiarie J, Farquhar C, John-Stewart G, Kakia A, Odoyo J, Mucunguzi A, Nakku-Joloba E, Twesigye R, Ngure K, Apaka C, Tamooh H, Gabona F, Mujugira A, Panteleeff D, Thomas KK, Kidoguchi L, Krows M, Revall J, Morrison S, Haugen H, Emmanuel-Ogier M, Ondrejcek L, Coombs RW, Frenkel L, Hendrix C, Bumpus NN, Bangsberg D, Haberer JE, Stevens WS, Lingappa JR, Celum C.** 2012. Antiretroviral Prophylaxis for Hiv Prevention in Heterosexual Men and Women. *N Engl J Med* 367(5): 399-410.
38. **Baig TT, Lanchy JM, Lodmell JS.** 2007. Hiv-2 Rna Dimerization Is Regulated by Intramolecular Interactions in Vitro. *RNA* 13(8): 1341-54.
39. **Bakhanashvili M, Novitsky E, Levy I, Rahav G.** 2005. The Fidelity of DNA Synthesis by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Increases in the Presence of Polyamines. *FEBS Lett* 579(6): 1435-40.
40. **Baleta A.** 2010. Antiretroviral Vaginal Gel Shows Promise against Hiv. *Lancet* 376(9738): 320.
41. **Balzarini J.** 2004. Current Status of the Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Curr Top Med Chem* 4(9): 921-44.
42. **Balzarini J, Pelemans H, Esnouf R, De Clercq E.** 1998. A Novel Mutation (F227I) Arises in the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 on Dose-Escalating Treatment of Hiv Type 1-Infected Cell Cultures with the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Thiocarboxanilide Uc-781. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(3): 255-60.
43. **Balzer S, Malde K, Lanzen A, Sharma A, Jonassen I.** 2010. Characteristics of 454 Pyrosequencing Data—Enabling Realistic Simulation with Flowsim. *Bioinformatics* 26(18): i420-5.
44. **Banke S, Lillemark MR, Gerstoft J, Obel N, Jorgensen LB.** 2009. Positive Selection Pressure Introduces Secondary Mutations at Gag Cleavage Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Harboring Major Protease Resistance Mutations. *J Virol* 83(17): 8916-24.
45. **Barbour JD, Grant RM.** 2005. The Role of Viral Fitness in Hiv Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2(1): 29-34.
46. **Barin F, McLane MF, Allan JS, Lee TH, Groopman JE, Essex M.** 1985. Virus Envelope Protein of Htlv-Iii Represents Major Target Antigen for Antibodies in Aids Patients. *Science* 228(4703): 1094-6.
47. **Barker E, Bossart KN, Levy JA.** 1998. Primary Cd8+ Cells from Hiv-Infected Individuals Can Suppress Productive Infection of Macrophages Independent of Beta-Chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1725-9.
48. **Barnett SW, Burke B, Sun Y, Kan E, Legg H, Lian Y, Bost K, Zhou F, Goodsell A, Zur Megede J, Polo J, Donnelly J, Ulmer J, Otten GR, Miller CJ, Vajdy M, Srivastava IK.** 2010. Antibody-Mediated Protection against Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Challenge of Macaques Immunized with Alphavirus Replicon Particles and Boosted with Trimeric Envelope Glycoprotein in Mf59 Adjuvant. *J Virol* 84(12): 5975-85.
49. **Barouch DH, Liu J, Li H, Maxfield LF, Abbink P, Lynch DM, Iampietro MJ, SanMiguel A, Seaman MS, Ferrari G, Forthal DN, Ourmanov I, Hirsch VM, Carville A, Mansfield KG, Stablein D, Pau MG, Schuitemaker H, Sadoff JC, Billings EA, Rao M, Robb ML, Kim JH, Marovich MA, Goudsmit J, Michael NL.** 2012. Vaccine Protection against Acquisition of Neutralization-Resistant Siv Challenges in Rhesus Monkeys. *Nature* 482(7383): 89-93.
50. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (Aids). *Science* 220(4599): 868-71.
51. **Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM.** 2010. Virological Follow-up of Adult Patients in Antiretroviral Treatment Programmes in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *Lancet Infect Dis* 10(3): 155-66.

52. **Basmaciogullari S, Babcock GJ, Van Ryk D, Wojtowicz W, Sodroski J.** 2002. Identification of Conserved and Variable Structures in the Human Immunodeficiency Virus Gp120 Glycoprotein of Importance for Cxcr4 Binding. *J Virol* 76(21): 10791-800.
53. **Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA.** 2008. Strand Transfer Events During Hiv-1 Reverse Transcription. *Virus Res* 134(1-2): 19-38.
54. **Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fanti WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM.** 1994. Hiv-1 Nef Leads to Inhibition or Activation of T Cells Depending on Its Intracellular Localization. *Immunity* 1 373-84.
55. **Baxter JD, Schapiro JM, Boucher CA, Kohlbrenner VM, Hall DB, Scherer JR, Mayers DL.** 2006. Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Associated with Reduced Susceptibility and Virologic Response to the Protease Inhibitor Tipranavir. *J Virol* 80(21): 10794-801.
56. **Beerens N, Berkhout B.** 2002. Switching the in Vitro Trna Usage of Hiv-1 by Simultaneous Adaptation of the Pbs and Pas. *RNA* 8(3): 357-69.
57. **Beerenwinkel N, Gunthard HF, Roth V, Metzner KJ.** 2012. Challenges and Opportunities in Estimating Viral Genetic Diversity from Next-Generation Sequencing Data. *Front Microbiol* 3 329.
58. **Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, Alencastro PR, Morgado MG.** 2008. Origin and Evolutionary History of Hiv-1 Subtype C in Brazil. *AIDS* 22(15): 1993-2000.
59. **Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CA, van de Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, Shafer RW.** 2009. Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted Hiv-1 Drug-Resistance: 2009 Update. *PLoS One* 4(3): e4724.
60. **Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF.** 2008. Recommendations for Surveillance of Transmitted Hiv Drug Resistance in Countries Scaling up Antiretroviral Treatment. *Antivir Ther* 13 Suppl 2 25-36.
61. **Berger A, Scherzed L, Sturmer M, Preiser W, Doerr HW, Rabenau HF.** 2005. Comparative Evaluation of the Cobas Amplicor Hiv-1 Monitor Ultrasensitive Test, the New Cobas Ampliprep/Cobas Amplicor Hiv-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant Hiv Rna 3.0 Assays for Quantitation of Hiv-1 Rna in Plasma Samples. *J Clin Virol* 33(1): 43-51.
62. **Berger EA, Murphy PM, Farber JM.** 1999. Chemokine Receptors as Hiv-1 Coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu Rev Immunol* 17 657-700.
63. **Berkhout B.** 1996. Structure and Function of the Human Immunodeficiency Virus Leader Rna. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54 1-34.
64. **Berkhout B, Vastenhouw NL, Klasens BI, Huthoff H.** 2001. Structural Features in the Hiv-1 Repeat Region Facilitate Strand Transfer During Reverse Transcription. *RNA* 7(8): 1097-114.
65. **Bernardini C, Maggiolo F.** 2013. Triple-Combination Rilpivirine, Emtricitabine, and Tenofovir (Complera/Eviplera) in the Treatment of Hiv Infection. *Patient Prefer Adherence* 7 531-42.
66. **Bessong PO, Nwobegahay J.** 2013. Genetic Analysis of Hiv-1 Integrase Sequences from Treatment Naive Individuals in Northeastern South Africa. *Int J Mol Sci* 14(3): 5013-24.
67. **Betancor G, Garriga C, Puertas MC, Nevot M, Anta L, Blanco JL, Perez-Elias MJ, de Mendoza C, Martinez MA, Martinez-Picado J, Menendez-Arias L, Iribarren JA, Caballero E, Ribera E, Libre JM, Clotet B, Jaen A, Dalmau D, Gatel JM, Peraire J, Vidal F, Vidal C, Riera M, Cordoba J, Lopez Aldeguer J, Galindo MJ, Gutierrez F, Alvarez M, Garcia F, Perez-Romero P, Viciiana P, Leal M, Palomares JC, Pineda JA, Viciiana I, Santos J, Rodriguez P, Gomez Sirvent JL, Gutierrez C, Moreno S, Perez-Olmeda M, Alcami J, Rodriguez C, del Romero J, Canizares A, Pedreira J, Miralles C, Ocampo A, Morano L, Aguilera A, Garrido C, Manuzza G, Poveda E, Soriano V.** 2012. Clinical, Virological and Biochemical Evidence Supporting the Association of Hiv-1 Reverse Transcriptase Polymorphism R284k and Thymidine Analogue Resistance Mutations M41I, L210W and T215Y in Patients Failing Tenofovir/Emtricitabine Therapy. *Retrovirology* 9 68.

68. **Bibollet-Ruche F, Bailes E, Gao F, Pourrut X, Barlow KL, Clewley JP, Mwenda JM, Langat DK, Chege GK, McClure HM, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** 2004. New Simian Immunodeficiency Virus Infecting De Brazza's Monkeys (*Cercopithecus Neglectus*): Evidence for a *Cercopithecus* Monkey Virus Clade. *J Virol* 78(14): 7748-62.
69. **Bieniasz PD.** 2012. An Overview of Intracellular Interactions between Immunodeficiency Viruses and Their Hosts. *AIDS* 26(10): 1243-54.
70. **Bigaillon C, Mérens A, Rapp C.** 2010. Intérêt Des Tests Génotypiques De Résistance Du Vih Aux Antirétroviraux En Pratique Clinique Quotidienne. *Rev Francoph laborat* 422 69-82.
71. **Bila DC, Young P, Merks H, Vubil AS, Mahomed M, Augusto A, Abreu CM, Mabunda NJ, Brooks JI, Tanuri A, Jani IV.** 2013. Evolution of Primary Hiv Drug Resistance in a Subtype C Dominated Epidemic in Mozambique. *PLoS One* 8(7): e68213.
72. **Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH.** 2002. Human Immunodeficiency Virus Superinfection and Recombination: Current State of Knowledge and Potential Clinical Consequences. *Clin Infect Dis* 34(8): 1108-14.
73. **Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer RW.** 2011. Hiv-1 Integrase Inhibitor Resistance and Its Clinical Implications. *J Infect Dis* 203(9): 1204-14.
74. **Blancou P, Vartanian JP, Christopherson C, Chenciner N, Basilico C, Kwok S, Wain-Hobson S.** 2001. Polio Vaccine Samples Not Linked to Aids. *Nature* 410(6832): 1045-6.
75. **Blish CA, Dogan OC, Derby NR, Nguyen MA, Chohan B, Richardson BA, Overbaugh J.** 2008. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Superinfection Occurs Despite Relatively Robust Neutralizing Antibody Responses. *J Virol* 82(24): 12094-103.
76. **Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfson A, Ganor Y, Roger MG, Mouz N, Amacker M, Chalifour A, Diomede L, Devillier G, Cong Z, Wei Q, Gao H, Qin C, Yang GB, Zurbriggen R, Lopalco L, Fleury S.** 2011. Immunization with Hiv-1 Gp41 Subunit Virosomes Induces Mucosal Antibodies Protecting Nonhuman Primates against Vaginal Shiv Challenges. *Immunity* 34(2): 269-80.
77. **Bonora S, Calcagno A, Cometto C, Fontana S, Aguilar D, D'Avolio A, Gonzalez de Requena D, Maiello A, Dal Conte I, Lucchini A, Di Perri G.** 2012. Short-Term Additional Enfuvirtide Therapy Is Associated with a Greater Immunological Recovery in Hiv Very Late Presenters: A Controlled Pilot Study. *Infection* 40(1): 69-75.
78. **Bourlet T, Signori-Schmuck A, Roche L, Icard V, Saoudin H, Trabaud MA, Tardy JC, Morand P, Pozzetto B, Ecochard R, Andre P.** 2011. Hiv-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J Clin Microbiol* 49(1): 292-7.
79. **Bozicevic I, Riedner G, Calleja JM.** 2013. Hiv Surveillance in Mena: Recent Developments and Results. *Sex Transm Infect*.
80. **Bracciale L, Fanti I, Di Giambenedetto S, Colafogli M, Prosperi M, Bacarelli A, Santangelo R, Cattani P, Cauda R, De Luca A.** 2009. Predictors of Successful Genotype-Guided Antiretroviral Therapy in Treatment-Experienced Individuals over Calendar Years: A Cohort Study. *J Clin Virol* 46(3): 290-4.
81. **Brady J, Kashanchi F.** 2005. Tat Gets the "Green" Light on Transcription Initiation. *Retrovirology* 2 69.
82. **Brandt S, Blissenbach M, Grewe B, Konietzny R, Grunwald T, Uberla K.** 2007. Rev Proteins of Human and Simian Immunodeficiency Virus Enhance Rna Encapsidation. *PLoS Pathog* 3(4): e54.
83. **Branson BM.** 2010. The Future of Hiv Testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55 Suppl 2 S102-5.
84. **Brauer M, De Villiers JC, Mayaphi SH.** 2013. Evaluation of the Determine Fourth Generation Hiv Rapid Assay. *J Virol Methods* 189(1): 180-3.
85. **Braun P, Ehret R, Wiesmann F, Zabbai F, Knickmann M, Kuhn R, Thamm S, Warnat G, Knechten H.** 2007. Comparison of Four Commercial Quantitative Hiv-1 Assays for Viral Load Monitoring in Clinical Daily Routine. *Clin Chem Lab Med* 45(1): 93-9.
86. **Brennan CA, 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, Gurtler LG, Zekeng L, Kaptue L.** 2008. The Prevalence of Diverse Hiv-1 Strains Was Stable in Cameroonian Blood Donors from 1996 to 2004. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49(4): 432-9.

87. **Brodin J, Mild M, Hedskog C, Sherwood E, Leitner T, Andersson B, Albert J.** 2013. Pcr-Induced Transitions Are the Major Source of Error in Cleaned Ultra-Deep Pyrosequencing Data. *PLoS One* 8(7): e70388.
88. **Bronze M, Steegen K, Wallis CL, De Wolf H, Papathanasopoulos MA, Van Houtte M, Stevens WS, de Wit TR, Stuyver LJ.** 2012. Hiv-1 Phenotypic Reverse Transcriptase Inhibitor Drug Resistance Test Interpretation Is Not Dependent on the Subtype of the Virus Backbone. *PLoS One* 7(4): e34708.
89. **Brown SA, Slobod KS, Surman S, Zirkel A, Zhan X, Hurwitz JL.** 2006. Individual Hiv Type 1 Envelope-Specific T Cell Responses and Epitopes Do Not Segregate by Virus Subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(2): 188-94.
90. **Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, Del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN.** 2008. Efficacy Assessment of a Cell-Mediated Immunity Hiv-1 Vaccine (the Step Study): A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Test-of-Concept Trial. *Lancet* 372(9653): 1881-93.
91. **Bucher JB, Thomas KM, Guzman D, Riley E, Dela Cruz N, Bangsberg DR.** 2007. Community-Based Rapid Hiv Testing in Homeless and Marginally Housed Adults in San Francisco. *HIV Med* 8(1): 28-31.
92. **Bunnik EM, Swenson LC, Edo-Matas D, Huang W, Dong W, Frantzell A, Petropoulos CJ, Coakley E, Schuitemaker H, Harrigan PR, van 't Wout AB.** 2011. Detection of Inferred Ccr5- and Cxcr4-Using Hiv-1 Variants and Evolutionary Intermediates Using Ultra-Deep Pyrosequencing. *PLoS Pathog* 7(6): e1002106.
93. **Bunupuradah T, Ananworanich J, Chetchotisakd P, Kantipong P, Jirajariyavej S, Sirivichayakul S, Munsakul W, Prasithsirikul W, Sungkanuparph S, Bowonwattanuwong C, Klinbuayaem V, Petoumenos K, Hirschel B, Bhakeecheep S, Ruxrungtham K.** 2011. Etravirine and Rilpivirine Resistance in Hiv-1 Subtype Crf01\_Ae-Infected Adults Failing Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based Regimens. *Antivir Ther* 16(7): 1113-21.
94. **Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Pilotti E, Casoli C, Lazzarin A, Tambussi G, Ciccozzi M, Rezza G, Buonaguro FM.** 2004. Screening of Hiv-1 Isolates by Reverse Heteroduplex Mobility Assay and Identification of Non-B Subtypes in Italy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37(2): 1295-306.
95. **Butler IF, Pandrea I, Marx PA, Apetrei C.** 2007. Hiv Genetic Diversity: Biological and Public Health Consequences. *Curr HIV Res* 5(1): 23-45.
96. **Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W.** 2010. Crystal Structure of Hiv-1 Gp41 Including Both Fusion Peptide and Membrane Proximal External Regions. *PLoS Pathog* 6(5): e1000880.
97. **Cahn P, Altclas J, Martins M, Losso M, Cassetti I, Cooper DA, Cox S.** 2011. Antiviral Activity of Apricitabine in Treatment-Experienced Hiv-1-Infected Patients with M184v Who Are Failing Combination Therapy. *HIV Med* 12(6): 334-42.
98. **Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Arruda MB, Gonzalez LM, Guimaraes JA, Diaz RS, Antunes OA, Tanuri A.** 2005. Low Accumulation of L90m in Protease from Subtype F Hiv-1 with Resistance to Protease Inhibitors Is Caused by the L89m Polymorphism. *J Infect Dis* 191(11): 1961-70.
99. **Campbell MS, Kahle EM, Celum C, Lingappa JR, Kapiga S, Mujugira A, Mugo NR, Fife KH, Mullins JI, Baeten JM.** 2013. Plasma Viral Loads During Early Hiv-1 Infection Are Similar in Subtype C- and Non-Subtype C-Infected African Seroconverters. *J Infect Dis* 207(7): 1166-70.
100. **Cane PA, de Ruiter A, Rice P, Wiselka M, Fox R, Pillay D.** 2001. Resistance-Associated Mutations in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Protease Gene from Treated and Untreated Patients in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 39(7): 2652-4.
101. **Cao S, Chen SJ.** 2011. Structure and Stability of Rna/Rna Kissing Complex: With Application to Hiv Dimerization Initiation Signal. *RNA* 17(12): 2130-43.
102. **Carne X.** 2007. Mécanismes Moléculaires De L'entrée Du Vih Dans Les Cellules Cibles. *Virologie* 11(Numéro spécial): 86-94.

103. Casado JL, Hertogs K, Ruiz L, Dronda F, Van Cauwenberge A, Arno A, Garcia-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(2): F1-7.
104. Nelson M, Diaz RS, Gathe J, de Andrade Neto JL, Slim J, Solano A, Netto EM, Mak C, Shen J, Greaves W, Dunkle LM, Vilchez RA, Zeinecker J. 2012. Vicriviroc Plus Optimized Background Therapy for Treatment-Experienced Subjects with Ccr5 Hiv-1 Infection: Final Results of Two Randomized Phase III Trials. *J Infect* 65(4): 326-35.
105. Casseb J, Katzenstein D, Winters M, Brigido LF, Duarte AJ, Hendry RM. 2002. Serotyping Hiv-1 with V3 Peptides: Detection of High Avidity Antibodies Presenting Clade-Specific Reactivity. *Braz J Med Biol Res* 35(3): 369-75.
106. Ceballos A, Remes Lenicov F, Sabatte J, Rodriguez Rodrigues C, Cabrini M, Jancic C, Raiden S, Donaldson M, Agustin Pasqualini R, Jr., Marin-Briggiler C, Vazquez-Levin M, Capani F, Amigorena S, Geffner J. 2009. Spermatozoa Capture Hiv-1 through Heparan Sulfate and Efficiently Transmit the Virus to Dendritic Cells. *J Exp Med* 206(12): 2717-33.
107. Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Sing T, Artese A, Santoro MM, Forbici F, Bertoli A, Alcaro S, Palamara G, d'Arminio Monforte A, Balzarini J, Antinori A, Lengauer T, Perno CF. 2007. Characterization and Structural Analysis of Novel Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Involved in the Regulation of Resistance to Nonnucleoside Inhibitors. *J Virol* 81(20): 11507-19.
108. Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B. 2002. Oligomeric Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein on the Virion Surface. *J Virol* 76(15): 7863-7.
109. Chaix ML, Desquillet L, Descamps D, Costagliola D, Deveau C, Galimand J, Goujard C, Signori-Schmuck A, Schneider V, Tamalet C, Pellegrin I, Wirden M, Masquelier B, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Meyer L. 2007. Response to Haart in French Patients with Resistant Hiv-1 Treated at Primary Infection: Anrs Resistance Network. *Antivir Ther* 12(8): 1305-10.
110. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. 1997. Core Structure of Gp41 from the Hiv Envelope Glycoprotein. *Cell* 89(2): 263-73.
111. Chaplin B, Eisen G, Idoko J, Onwujekwe D, Idigbe E, Adewole I, Gashau W, Meloni S, Sarr AD, Sankale JL, Ekong E, Murphy RL, Kanki P. 2011. Impact of Hiv Type 1 Subtype on Drug Resistance Mutations in Nigerian Patients Failing First-Line Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27(1): 71-80.
112. Chavez P, Wesolowski L, Patel P, Delaney K, Owen SM. 2011. Evaluation of the Performance of the Abbott Architect Hiv Ag/Ab Combo Assay. *J Clin Virol* 52 Suppl 1 S51-5.
113. Chazal N. 2005. Assemblage, Bourgeonnement Et Maturation Du Vih-1. *Virologie* 9 215-27.
114. Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. 2011. Hiv-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *J Mol Biol* 410(4): 582-608.
115. Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. 2002. Hiv-1 Tat Targets Microtubules to Induce Apoptosis, a Process Promoted by the Pro-Apoptotic Bcl-2 Relative Bim. *EMBO J* 21(24): 6801-10.
116. Chen JC, Krucinski J, Miercke LJ, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, Stroud RM. 2000. 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* 97(15): 8233-8.
117. Chen JH, Wong KH, Chan K, Lam HY, Lee SS, Li P, Lee MP, Tsang DN, Zheng BJ, Yuen KY, Yam WC. 2007. Evaluation of an in-House Genotyping Resistance Test for Hiv-1 Drug Resistance Interpretation and Genotyping. *J Clin Virol* 39(2): 125-31.
118. Chen JH, Wong KH, Chen Z, Chan K, Lam HY, To SW, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. 2010. Increased Genetic Diversity of Hiv-1 Circulating in Hong Kong. *PLoS One* 5(8): e12198.
119. Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S. 2004. Vpr-Mediated Incorporation of Ung2 into Hiv-1 Particles Is Required to Modulate the Virus Mutation Rate and for Replication in Macrophages. *J Biol Chem* 279(27): 28419-25.
120. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, De Clercq E, Debyser Z. 2003. Hiv-1 Integrase Forms Stable Tetramers and Associates with Ledgf/P75 Protein in Human Cells. *J Biol Chem* 278(1): 372-81.

121. Chibo D, Birch C. 2012. Increasing Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Circulating in Australia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(6): 578-83.
122. Choi JY, Kim EJ, Rho HJ, Kim JY, Kwon OK, Lee JH, Koo MJ, Kim SS. 2009. Evaluation of the Nuclisens Easyq Hiv-1 V1.1 and Realtime Hiv-1 Kits for Quantitation of Hiv-1 RNA in Plasma. *J Virol Methods* 161(1): 7-11.
123. Chow WZ, Ong LY, Razak SH, Lee YM, Ng KT, Yong YK, Azmel A, Takebe Y, Al-Darraji HA, Kamarulzaman A, Tee KK. 2013. Molecular Diversity of Hiv-1 among People Who Inject Drugs in Kuala Lumpur, Malaysia: Massive Expansion of Circulating Recombinant Form (Crfs) 33\_01b and Emergence of Multiple Unique Recombinant Clusters. *PLoS One* 8(5): e62560.
124. Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, Gill MJ. 2011. Comparison of the Realtime Hiv-1, Cobas Taqman 48 V1.0, Easy Q V1.2, and Versant V3.0 Assays for Determination of Hiv-1 Viral Loads in a Cohort of Canadian Patients with Diverse Hiv Subtype Infections. *J Clin Microbiol* 49(1): 118-24.
125. Church JD, Huang W, Mwatha A, Musoke P, Jackson JB, Bagenda D, Omer SB, Donnell D, Nakabiito C, Eure C, Guay LA, Taylor A, Bakaki PM, Matovu F, McConnell M, Fowler MG, Eshleman SH. 2010. Analysis of Hiv Tropism in Ugandan Infants. *Curr HIV Res* 8(7): 498-503.
126. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, Moore JP, Trkola A, Morris L. 2003. The Ccr5 and Cxcr4 Coreceptors Are Both Used by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates from Subtype C. *J Virol* 77(7): 4449-56.
127. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. 1986. Molecular Cloning and Polymorphism of the Human Immune Deficiency Virus Type 2. *Nature* 324(6098): 691-95.
128. Clever JL, Miranda D, Jr., Parslow TG. 2002. RNA Structure and Packaging Signals in the 5' Leader Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. *J Virol* 76(23): 12381-7.
129. Clotet B, Bellos N, Molina JM, Cooper D, Goffard JC, Lazzarin A, Wohrmann A, Katlama C, Wilkin T, Haubrich R, Cohen C, Farthing C, Jayaweera D, Markowitz M, Ruane P, Spinosa-Guzman S, Lefebvre E. 2007. Efficacy and Safety of Darunavir-Ritonavir at Week 48 in Treatment-Experienced Patients with Hiv-1 Infection in Power 1 and 2: A Pooled Subgroup Analysis of Data from Two Randomised Trials. *Lancet* 369(9568): 1169-78.
130. Coffin JM, Essex M, Gallo R, Graf T, Hinuma Y, Hunter E. 2003. Retroviridae with Ictv Report.
131. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. 1997. The Interactions of Retroviruses and Their Hosts, Coffin JM, et coll., *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY):
132. Cohen CJ, Molina JM, Cahn P, Clotet B, Fourie J, Grinsztejn B, Wu H, Johnson MA, Saag M, Supparatpinyo K, Crauwels H, Lefebvre E, Rimsky LT, Vanveggel S, Williams P, Boven K. 2012. Efficacy and Safety of Rilpivirine (Tmc278) Versus Efavirenz at 48 Weeks in Treatment-Naive Hiv-1-Infected Patients: Pooled Results from the Phase 3 Double-Blind Randomized Echo and Thrive Trials. *J Acquir Immune Defic Syndr* 60(1): 33-42.
133. Cohen J. 2003. Public Health. Aids Vaccine Trial Produces Disappointment and Confusion. *Science* 299(5611): 1290-1.
134. Collinson-Streng AN, Redd AD, Sewankambo NK, Serwadda D, Rezapour M, Lamers SL, Gray RH, Wawer MJ, Quinn TC, Laeyendecker O. 2009. Geographic Hiv Type 1 Subtype Distribution in Rakai District, Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(10): 1045-8.
135. Colombo R, Rose R, McLaren C, Thiry A, Parkin N, Friberg J. 2004. Identification of I50I as the Signature Atazanavir (Atv)-Resistance Mutation in Treatment-Naive Hiv-1-Infected Patients Receiving Atv-Containing Regimens. *J Infect Dis* 189(10): 1802-10.
136. Costin J. 2007. Cytopathic Mechanisms of Hiv-1. *Virol J* 4 100.
137. Cousins MM, Ou SS, Wawer MJ, Munshaw S, Swan D, Magaret CA, Mullis CE, Serwadda D, Porcella SF, Gray RH, Quinn TC, Donnell D, Eshleman SH, Redd AD. 2012. Comparison of a High-Resolution Melting Assay to Next-Generation Sequencing for Analysis of Hiv Diversity. *J Clin Microbiol* 50(9): 3054-9.
138. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S, Lundgren JD. 2005. Thymidine Analogue Mutation Profiles: Factors Associated with Acquiring Specific Profiles and Their Impact on the Virological Response to Therapy. *Antivir Ther* 10(7): 791-802.

139. Cranston RD, Hoesley C, Carballo-Diequez A, Hendrix C, Husnik M, Levy L, Hall W, Soto-Torres L, Nel AM. 2013. A Randomized Male Tolerance Study of Dapivirine Gel Following Multiple Topical Penile Exposures (Mtn 012/Ipm 010). *AIDS Res Hum Retroviruses*.
140. Cribier A, Emilliani S. 2007. Les Partenaires Cellulaires De L'intégrase Du Vih1 : Vers De Nouvelles Cibles Thérapeutiques. . *Virologie* N° Spécial S 153-62.
141. Crublet E, Andrieu JP, Vives RR, Lortat-Jacob H. 2008. The Hiv-1 Envelope Glycoprotein Gp120 Features Four Heparan Sulfate Binding Domains, Including the Co-Receptor Binding Site. *J Biol Chem* 283(22): 15193-200.
142. Cullen BR. 1990. The Hiv-1 Tat Protein: An Rna Sequence-Specific Processivity Factor? *Cell* 63(4): 655-7.
143. da Silva D, Van Wesenbeeck L, Breilh D, Reigadas S, Anies G, Van Baelen K, Morlat P, Neau D, Dupon M, Wittkop L, Fleury H, Masquelier B. 2010. Hiv-1 Resistance Patterns to Integrase Inhibitors in Antiretroviral-Experienced Patients with Virological Failure on Raltegravir-Containing Regimens. *J Antimicrob Chemother* 65(6): 1262-9.
144. Daar ES, Richman DD. 2005. Confronting the Emergence of Drug-Resistant Hiv Type 1: Impact of Antiretroviral Therapy on Individual and Population Resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(5): 343-57.
145. Dam E, Quercia R, Glass B, Descamps D, Launay O, Duval X, Krausslich HG, Hance AJ, Clavel F. 2009. Gag Mutations Strongly Contribute to Hiv-1 Resistance to Protease Inhibitors in Highly Drug-Experienced Patients Besides Compensating for Fitness Loss. *PLoS Pathog* 5(3): e1000345.
146. Damond F, Descamps D. 1998. Résistance Du Vlh Aux Antirétroviraux : Évaluations Virologiques Des Thérapeutiques. *Rev française lab* 305 51-55.
147. Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F. 2004. Identification of a Highly Divergent Hiv Type 2 and Proposal for a Change in Hiv Type 2 Classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(6): 666-72.
148. Dandekar DH, Ganesh KN, Mitra D. 2004. Hiv-1 Tat Directly Binds to Nfkappab Enhancer Sequence: Role in Viral and Cellular Gene Expression. *Nucleic Acids Res* 32(4): 1270-8.
149. Das AT, Vrolijk MM, Harwig A, Berkhout B. 2012. Opening of the Tar Hairpin in the Hiv-1 Genome Causes Aberrant Rna Dimerization and Packaging. *Retrovirology* 9 59.
150. Davis M, Jiang J, Zhou J, Freed E, Aiken C. 2006. A Mutation in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Destabilizes the Interaction of Envelope Protein Subunits Gp120 and Gp41. *J. Virol.* 80 2405-17.
151. De Luca A, Dunn D, Zazzi M, Camacho R, Torti C, Fanti I, Kaiser R, Sonnerborg A, Codoner FM, Van Laethem K, Vandamme AM, Bansi L, Ghisetti V, van de Vijver DA, Asboe D, Prospieri MC, Di Giambenedetto S. 2013. Declining Prevalence of Hiv-1 Drug Resistance in Antiretroviral Treatment-Exposed Individuals in Western Europe. *J Infect Dis* 207(8): 1216-20.
152. de Meyer S, Vangeneugden T, van Baelen B, de Paepe E, van Marck H, Picchio G, Lefebvre E, de Bethune MP. 2008. Resistance Profile of Darunavir: Combined 24-Week Results from the Power Trials. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(3): 379-88.
153. de Oliveira T, Engelbrecht S, Janse van Rensburg E, Gordon M, Bishop K, zur Megede J, Barnett SW, Cassol S. 2003. Variability at Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Protease Cleavage Sites: An Indication of Viral Fitness? *J Virol* 77(17): 9422-30.
154. Debattista J, Bryson G, Roudenko N, Dwyer J, Kelly M, Hogan P, Patten J. 2007. Pilot of Non-Invasive (Oral Fluid) Testing for Hiv within a Clinical Setting. *Sex Health* 4(2): 105-9.
155. del Amo J, del Romero J, Barrasa A, Perez-Hoyos S, Rodriguez C, Diez M, Garcia S, Soriano V, Castilla J. 2002. Factors Influencing Hiv Progression in a Seroconverter Cohort in Madrid from 1985 to 1999. *Sex Transm Infect* 78(4): 255-60.
156. Delaney KP, Heffelfinger JD, Wesolowski LG, Owen SM, Meyer WA, 3rd, Kennedy S, Uniyal A, Kerndt PR, Branson BM. 2011. Performance of an Alternative Laboratory-Based Algorithm for Hiv Diagnosis in a High-Risk Population. *J Clin Virol* 52 Suppl 1 S5-10.
157. Delarue S, Didier E, Damond F, Poncarme D, Brengle-Pesce K, Resche-Rigon M, Vray M, Gueudin M, Simon F. 2013. Highly Sensitive Plasma Rna Quantification by Real-Time Pcr in Hiv-2 Group a and Group B Infection. *J Clin Virol* 58(2): 461-7.
158. Delatorre EO, Bello G. 2012. Phylogenetics of Hiv-1 Subtype C Epidemic in East Africa. *PLoS One* 7(7): e41904.

159. **Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier JC, Simon F.** 2011. Hiv-1 Group N: Travelling Beyond Cameroon. *Lancet* 378(9806): 1894.
160. **Delelis O, Carayon K, Saib A, Deprez E, Mouscadet JF.** 2008. Integrase and Integration: Biochemical Activities of Hiv-1 Integrase. *Retrovirology* 5 114.
161. **Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcellin AG, Subra F, Deprez E, Mouscadet JF.** 2009. The G140s Mutation in Hiv Integrases from Raltegravir-Resistant Patients Rescues Catalytic Defect Due to the Resistance Q148h Mutation. *Nucleic Acids Res* 37(4): 1193-201.
162. **Delgado E, Ampofo WK, Sierra M, Torpey K, Perez-Alvarez L, Bonney EY, Mukadi YD, Lartey M, Nyarko C, Amenyah RN, Thomson M, Najera R.** 2008. High Prevalence of Unique Recombinant Forms of Hiv-1 in Ghana: Molecular Epidemiology from an Antiretroviral Resistance Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48(5): 599-606.
163. **Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Barr R, Pathak VK.** 2007. Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rnase H Primer Grip Enhance 3'-Azido-3'-Deoxythymidine Resistance. *J Virol* 81(13): 6837-45.
164. **Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, Mullins JI.** 1993. Genetic Relationships Determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: Analysis of Hiv-1 Env Genes. *Science* 262(5137): 1257-61.
165. **Depatureaux A, Leoz M, De Oliveira F, Gueudin M, Diamond F, Descamps D, Brun-Vezinet F, Lemee V, Simon F, Barin F, Plantier JC.** 2010. [Specific Diagnosis and Follow-up of Hiv-1 Group O Infection: Res-O Data]. *Med Mal Infect* 40(12): 669-76.
166. **Derache A, Maiga AI, Traore O, Akonde A, Cisse M, Jarrousse B, Koita V, Diarra B, Carcelain G, Barin F, Pizzocolo C, Pizarro L, Katlama C, Calvez V, Marcellin AG.** 2008. Evolution of Genetic Diversity and Drug Resistance Mutations in Hiv-1 among Untreated Patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 62(3): 456-63.
167. **Descamps D, Apetrei C, Collin G, Diamond F, Simon F, Brun-Vezinet F.** 1998. Naturally Occurring Decreased Susceptibility of Hiv-1 Subtype G to Protease Inhibitors. *AIDS* 12(9): 1109-11.
168. **Descamps D, Collin G, Letourneur F, Apetrei C, Diamond F, Loussert-Ajaka I, Simon F, Saragosti S, Brun-Vezinet F.** 1997. Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Isolates to Antiretroviral Agents: In Vitro Phenotypic and Genotypic Analyses. *J Virol* 71(11): 8893-8.
169. **di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG.** 1986. Characterization of Highly Immunogenic P66/P51 as the Reverse Transcriptase of Htlv-Iii/Lav. *Science* 231(4743): 1289-91.
170. **Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Leye N, Ngom-Gueye NF, Montavon C, Peeters M, Mboup S.** 2010. Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Antiretroviral-Naive Patients from Senegal. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26(10): 1133-8.
171. **Diouara A, Diop-Ndiaye H, Kebe-Fall K, Tchiakpè E, Ndiaye O, Ayouba A, Peeters M, Mboup S, Kane C.** . 2014. Dried Blood Spots for Hiv-1 Drug Resistance Genotyping in Decentralized Settings in Senegal. *J Med Virol.* 86(1): 45-51.
172. **Djoko CF, 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.** 2011. 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* 27(3): 323-9.
173. **Donaghy H, Wilkinson J, Cunningham AL.** 2006. Hiv Interactions with Dendritic Cells: Has Our Focus Been Too Narrow? *J Leukoc Biol* 80(5): 1001-12.
174. **Drexler JF, de Souza Luna LK, Pedroso C, Pedral-Sampaio DB, Queiroz AT, Brites C, Netto EM, Drosten C.** 2007. Rates of and Reasons for Failure of Commercial Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Load Assays in Brazil. *J Clin Microbiol* 45(6): 2061-3.
175. **D'Souza V, Summers MF.** 2005. How Retroviruses Select Their Genomes. *Nat Rev Microbiol* 3(8): 643-55.

176. **Duc NB, Hien BT, Wagar N, Tram TH, Giang le T, Yang C, Wolfe MI, Hien NT, Tuan NA.** 2012. Surveillance of Transmitted Hiv Drug Resistance Using Matched Plasma and Dried Blood Spot Specimens from Voluntary Counseling and Testing Sites in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2007-2008. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 4 S343-7.
177. **Dumond JB, Patterson KB, Pecha AL, Werner RE, Andrews E, Damle B, Tressler R, Worsley J, Kashuba AD.** 2009. Maraviroc Concentrates in the Cervicovaginal Fluid and Vaginal Tissue of Hiv-Negative Women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 51(5 ): 546-53.
178. **Dykes C, Demeter LM.** 2007. Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Fitness. *Clin Microbiol Rev* 20(4): 550-78.
179. **Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, Tatt ID, Geretti AM, Zuckerman M.** 2010. Impact of Hiv-1 Viral Subtype on Disease Progression and Response to Antiretroviral Therapy. *J Int AIDS Soc* 13 4.
180. **Eberle J, Loussert-Ajaka I, Brust S, Zekeng L, Hauser PH, Kaptue L, Knapp S, Damond F, Saragosti S, Simon F, Gurtler LG.** 1997. Diversity of the Immunodominant Epitope of Gp41 of Hiv-1 Subtype O and Its Validity for Antibody Detection. *J Virol Methods* 67(1): 85-91.
181. **Eckert DM, Kim PS.** 2001. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. *Annu Rev Biochem* 70 777-810.
182. **Efron B.** 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann of Statist* 7(1): 1-26.
183. **El Annaz H, Recordon-Pinson P, Tagajdid R, Doblali T, Belefquih B, Oumakhir S, Sedrati O, Mrani S, Fleury H.** 2012. Drug Resistance Mutations in Hiv Type 1 Isolates from Patients Failing Antiretroviral Therapy in Morocco. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(8): 944-8.
184. **Elharti E, Zidouh A, Mengad R, Bennani O, Elaouad R.** 2002. Monitoring Hiv through Sentinel Surveillance in Morocco. *East Mediterr Health J* 8(1): 141-9.
185. **El-Khatib Z, Ekstrom AM, Ledwaba J, Mohapi L, Laher F, Karstaedt A, Charalambous S, Petzold M, Katzenstein D, Morris L.** 2010. Viremia and Drug Resistance among Hiv-1 Patients on Antiretroviral Treatment: A Cross-Sectional Study in Soweto, South Africa. *AIDS* 24(11): 1679-87.
186. **Elmi Abar A, Jlizi A, Darar HY, Kacem MA, Slim A.** 2012. Hiv-1 Drug Resistance Genotyping from Antiretroviral Therapy (Art) Naive and First-Line Treatment Failures in Djiboutian Patients. *Diagn Pathol* 7 138.
187. **Eron JJ, Cooper DA, Steigbigel RT, Clotet B, Gatell JM, Kumar PN, Rockstroh JK, Schechter M, Markowitz M, Yeni P, Loutfy MR, Lazzarin A, Lennox JL, Strohmaier KM, Wan H, Barnard RJ, Nguyen BY, Teppler H.** 2013. Efficacy and Safety of Raltegravir for Treatment of Hiv for 5 Years in the Benchmrk Studies: Final Results of Two Randomised, Placebo-Controlled Trials. *Lancet Infect Dis* 13(7): 587-96.
188. **Esbjornsson J, Mild M, Mansson F, Norrgren H, Medstrand P.** 2011. Hiv-1 Molecular Epidemiology in Guinea-Bissau, West Africa: Origin, Demography and Migrations. *PLoS One* 6(2): e17025.
189. **Este JA, Telenti A.** 2007. Hiv Entry Inhibitors. *Lancet* 370(9581): 81-8.
190. **Etienne L.** 2010. Origine Du Vih, Une Réussite Émergencielle. *Virologie* 14(3): 171-84.
191. **Etienne L, Eymard-Duvernay S, Aghokeng A, Butel C, Monleau M, Peeters M.** 2013. Single Real-Time Reverse Transcription-Pcr Assay for Detection and Quantification of Genetically Diverse Hiv-1, Sivcpz, and Sivgor Strains. *J Clin Microbiol* 51(3): 787-98.
192. **Etienne L, Nerrienet E, LeBreton M, Bibila GT, Fouppouapouognigni Y, Rousset D, Nana A, Djoko CF, Tamoufe U, Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Peeters M, Wolfe ND, Ayouba A.** 2011. Characterization of a New Simian Immunodeficiency Virus Strain in a Naturally Infected Pan Troglodytes Troglodytes Chimpanzee with Aids Related Symptoms. *Retrovirology* 8 4.
193. **Faraoni S, Rocchetti A, Gotta F, Ruggiero T, Orofino G, Bonora S, Ghisetti V.** 2013. Evaluation of a Rapid Antigen and Antibody Combination Test in Acute Hiv Infection. *J Clin Virol* 57(1): 84-7.

194. **Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, Hirschel B, Tebas P, Raffi F, Trottier B, Bellos N, Saag M, Cooper DA, Westby M, Tawadrous M, Sullivan JF, Ridgway C, Dunne MW, Felstead S, Mayer H, van der Ryst E.** 2008. Subgroup Analyses of Maraviroc in Previously Treated R5 Hiv-1 Infection. *N Engl J Med* 359(14): 1442-55.
195. **Felsenstein J.** 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *J Mol Evol* 17(6): 368-76.
196. **Felsenstein J.** 1985. Confidences Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-91.
197. **Feng YX, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A.** 1999. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Has Nucleic Acid Chaperone Activity: Possible Role in Dimerization of Genomic Rna and Placement of Trna on the Primer Binding Site. *J Virol* 73(5): 4251-6.
198. **Fernandez-Montero JV, Vispo E, Anta L, de Mendoza C, Soriano V.** 2012. Rilpivirine: A Next-Generation Non-Nucleoside Analogue for the Treatment of Hiv Infection. *Expert Opin Pharmacother* 13(7): 1007-14.
199. **Fitton T, Leschonsky B, Bieler K, Paulus C, Schroder J, Wolf H, Wagner R.** 2000. Proline Residues in the Hiv-1 Nh2-Terminal Capsid Domain: Structure Determinants for Proper Core Assembly and Subsequent Steps of Early Replication. *Virology* 268(2): 294-307.
200. **Fletcher CV, DeVille JG, Samson PM, Moye JH, Jr., Church JA, Spiegel HM, Palumbo P, Fenton T, Smith ME, Graham B, Kraimer JM, Shearer WT.** 2007. Nonlinear Pharmacokinetics of High-Dose Recombinant Fusion Protein Cd4-Igg2 (Pro 542) Observed in Hiv-1-Infected Children. *J Allergy Clin Immunol* 119(3): 747-50.
201. **Floch J.** 1990. Diagnostic Biologique De L'infection À Vih En Afrique. Mise En Place D'une Nouvelle Technique Localement. *Méd d'Afrique Noire* 119(3): 574-82.
202. **Franke EK, Yuan HE, Luban J.** 1994. Specific Incorporation of Cyclophilin a into Hiv-1 Virions. *Nature* 372(6504): 359-62.
203. **Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M, Petropoulos CJ, Huang W.** 2009. Loss of Raltegravir Susceptibility by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Conferred Via Multiple Nonoverlapping Genetic Pathways. *J Virol* 83(22): 11440-6.
204. **Fransen S, Gupta S, Frantzell A, Petropoulos CJ, Huang W.** 2012. Substitutions at Amino Acid Positions 143, 148, and 155 of Hiv-1 Integrase Define Distinct Genetic Barriers to Raltegravir Resistance in Vivo. *J Virol* 86(13): 7249-55.
205. **Frater AJ, Dunn DT, Beardall AJ, Ariyoshi K, Clarke JR, McClure MO, Weber JN.** 2002. Comparative Response of African Hiv-1-Infected Individuals to Highly Active Antiretroviral Therapy. *AIDS* 16(8): 1139-46.
206. **Freed EO.** 1998. Hiv-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology* 251(1): 1-15.
207. **Freed EO.** 2001. Hiv-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6): 13-33.
208. **Freeman MM, Seaman MS, Rits-Volloch S, Hong X, Kao CY, Ho DD, Chen B.** 2010. Crystal Structure of Hiv-1 Primary Receptor Cd4 in Complex with a Potent Antiviral Antibody. *Structure* 18(12): 1632-41.
209. **Frickmann H, Schwarz NG, Girmann M, Hagen RM, Poppert S, Crusius S, Podbielski A, Heriniaina JN, Razafindrabe T, Rakotondrainiarivo JP, May J, Rakotozandrindrainy R.** 2013. Serological Survey of Hiv and Syphilis in Pregnant Women in Madagascar. *Trop Med Int Health* 18(1): 35-9.
210. **Gaibelet G, Planchenault T, Mazeres S, Dumas F, Arenzana-Seisdedos F, Lopez A, Lagane B, Bachelerie F.** 2006. Cd4 and Ccr5 Constitutively Interact at the Plasma Membrane of Living Cells: A Confocal Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Approach. *J Biol Chem* 281(49): 37921-9.
211. **Gaibelet G, Planchenault T, Mazères S, Dumas F, Arenzana-Seisdedos F, Lopez A, Lagane B, Bachelerie F.** 2006 Cd4 and Ccr5 Constitutively Interact at the Plasma Membrane of Living Cells: A Confocal Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Approach. *J. Biol. Chem.* 281(49): 37921-9.

212. Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Pozniak AL, Gazzard B, Campo RE, Lu B, McColl D, Chuck S, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK. 2006. Tenofovir Df, Emtricitabine, and Efavirenz Vs. Zidovudine, Lamivudine, and Efavirenz for Hiv. *N Engl J Med* 354(3): 251-60.
213. Gallego O, Martin-Carbonero L, Aguero J, de Mendoza C, Corral A, Soriano V. 2004. Correlation between Rules-Based Interpretation and Virtual Phenotype Interpretation of Hiv-1 Genotypes for Predicting Drug Resistance in Hiv-Infected Individuals. *J Virol Methods* 121(1): 115-8.
214. Gallien S, Braun J, Delaugerre C, Charreau I, Reynes J, Jeanblanc F, Verdon R, de Truchis P, May T, Madelaine-Chambrin I, Aboulker JP, Molina JM. 2011. Efficacy and Safety of Raltegravir in Treatment-Experienced Hiv-1-Infected Patients Switching from Enfuvirtide-Based Regimens: 48 Week Results of the Randomized Easier Anrs 138 Trial. *J Antimicrob Chemother* 66(9): 2099-106.
215. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. 1983. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (Aids). *Science* 220(4599): 865-7.
216. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R. 2003. The Hiv Env-Mediated Fusion Reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614(1): 36-50.
217. Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP. 1997. Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the Hiv-1 Capsid Protein. *Science* 278(5339): 849-53.
218. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1999. Origin of Hiv-1 in the Chimpanzee Pan Troglodytes Troglodytes. *Nature* 397(6718): 436-41.
219. 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. 2001. Evidence of Two Distinct Subsubtypes within the Hiv-1 Subtype a Radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17(8): 675-88.
220. Garcia MN, dos Ramos Farias MS, Fazzi L, Grasso D, Rabinovich RD, Avila MM. 2012. Presence of IgG Anti-Gp160/120 Antibodies Confers Higher Hiv Capture Capacity to Erythrocytes from Hiv-Positive Individuals. *PLoS One* 7(9): e45808.
221. Garcia-Lerma JG, McNulty A, Jennings C, Huang D, Heneine W, Bremer JW. 2009. Rapid Decline in the Efficiency of Hiv Drug Resistance Genotyping from Dried Blood Spots (Dbs) and Dried Plasma Spots (Dps) Stored at 37 Degrees C and High Humidity. *J Antimicrob Chemother* 64(1): 33-6.
222. Geelen S, Lange J, Borleffs J, Wolfs T, Weersink A, Schuurman R. 2003. Failure to Detect a Non-B Hiv-1 Subtype by the Hiv-1 Amplicor Monitor Test, Version 1.5: A Case of Unexpected Vertical Transmission. *AIDS* 17(5): 781-2.
223. Geijtenbeek TB, 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. 2000. Dc-Sign, a Dendritic Cell-Specific Hiv-1-Binding Protein That Enhances Trans-Infection of T Cells. *Cell* 100(5): 587-97.
224. Ghosh RK, Ghosh SM, Chawla S. 2011. Recent Advances in Antiretroviral Drugs. *Expert Opin Pharmacother* 12(1): 31-46.
225. Ghys PD, Jenkins C, Pisani E. 2001. Hiv Surveillance among Female Sex Workers. *AIDS* 15 Suppl 3 S33-40.
226. Goila-Gaur R, Strelbel K. 2008. Hiv-1 Vif, Apobec, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* 5 51.
227. Gomes P, Carvalho AP, Diogo I, Goncalves F, Costa I, Cabanas J, Camacho RJ. 2013. Comparison of the Nuclisens Easyq Hiv-1 V2.0 with Abbott M2000rt Realtime Hiv-1 Assay for Plasma Rna Quantitation in Different Hiv-1 Subtypes. *J Virol Methods* 193(1): 18-22.
228. Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, Duarte G, De Souza R, Soto-Ramirez L, Salomon H. 2006. Analysis of Hiv Type 1 Diversity in Pregnant Women from Four Latin American and Caribbean Countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(11): 1186-91.

229. **Goodenow MM, Collman RG.** 2006. Hiv-1 Coreceptor Preference Is Distinct from Target Cell Tropism: A Dual-Parameter Nomenclature to Define Viral Phenotypes. *J Leukoc Biol* 80(5): 965-72.
230. **Gorny M, Zolla-Pazner S.** 2000. Recognition by Human Monoclonal Antibodies of Free and Complexed Peptides Representing the Prefusogenic and Fusogenic Forms of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gp41. *J Virol* 74(13): 6186-92.
231. **Gottlieb GS, Smith RA, Dia Badiane NM, Ba S, Hawes SE, Toure M, Starling AK, Traore F, Sall F, Cherne SL, Stern J, Wong KG, Lu P, Kim M, Raugi DN, Lam A, Mullins JI, Kiviat NB.** 2011. Hiv-2 Integrase Variation in Integrase Inhibitor-Naive Adults in Senegal, West Africa. *PLoS One* 6(7): e22204.
232. **Gottlinger HG.** 2001. The Hiv-1 Assembly Machine. *AIDS* 15 Suppl 5 S13-20.
233. **Graf T, Passaes CP, Ferreira LG, Grisard EC, Morgado MG, Bello G, Pinto AR.** 2011. Hiv-1 Genetic Diversity and Drug Resistance among Treatment Naive Patients from Southern Brazil: An Association of Hiv-1 Subtypes with Exposure Categories. *J Clin Virol* 51(3): 186-91.
234. **Graf T, Pinto AR.** 2013. The Increasing Prevalence of Hiv-1 Subtype C in Southern Brazil and Its Dispersion through the Continent. *Virology* 435(1): 170-8.
235. **Graham WD, Barley-Malone L, Stark CJ, Kaur A, Stolarchuk C, Sproat B, Leszczynska G, Malkiewicz A, Safwat N, Mucha P, Guenther R, Agris PF.** 2011. Functional Recognition of the Modified Human Trnaly3(Uuu) Anticodon Domain by Hiv's Nucleocapsid Protein and a Peptide Mimic. *J Mol Biol* 410(4): 698-715.
236. **Granade TC, Nguyen S, Kuehl DS, Parekh BS.** 2013. Development of a Novel Rapid Hiv Test for Simultaneous Detection of Recent or Long-Term Hiv Type 1 Infection Using a Single Testing Device. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(1): 61-7.
237. **Greene WC, Peterlin BM.** 2002. Charting Hiv's Remarkable Voyage through the Cell: Basic Science as a Passport to Future Therapy. *Nat Med* 8(7): 673-80.
238. **Greig J, du Cros P, Klarkowski D, Mills C, Jorgensen S, Harrigan PR, O'Brien DP.** 2011. Viral Load Testing in a Resource-Limited Setting: Quality Control Is Critical. *J Int AIDS Soc* 14 23.
239. **Groom HC, Anderson EC, Dangerfield JA, Lever AM.** 2009. Rev Regulates Translation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rnas. *J Gen Virol* 90(Pt 5): 1141-7.
240. **Guest G, Shattuck D, Johnson L, Akumatey B, Clarke EE, Chen PL, Macqueen KM.** 2010. Acceptability of Prep for Hiv Prevention among Women at High Risk for Hiv. *J Womens Health (Larchmt)* 19(4): 791-8.
241. **Gueye Ndiaye A, Faye C, Ndiaye I, Fall K, Gueye Gaye A, Diop I, Mboup S.** 2009. Dépistage Du Vih, De La Syphilis, Des Infections Dues À Chlamydia Trachomatis Et À Neisseria Gonorrhoeæ Au Cours D'une Enquête Combinée Conduite À Malicounda, Une Zone Rurale Du Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot.* 102(3): 150-54.
242. **Guimaraes ML, Velarde-Dunois KG, Segurondo D, Morgado MG.** 2012. The Hiv-1 Epidemic in Bolivia Is Dominated by Subtype B and Crf12\_Bf "Family" Strains. *Virol J* 9 19.
243. **Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of Phym 3.0. *Syst Biol* 59(3): 307-21.
244. **Guindon S, Gascuel O.** 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52(5): 696-704.
245. **Gulick RM.** 2010. Antiretroviral Treatment 2010: Progress and Controversies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55 Suppl 1 S43-8.
246. **Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H.** 2008. Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 Hiv-1 Infection. *N Engl J Med* 359(14): 1429-41.
247. **Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, Kleiman L.** 2007. The Interaction of Apobec3g with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Inhibits Trna3lys Annealing to Viral Rna. *J Virol* 81(20): 11322-31.
248. **Guo F, Saadatmand J, Niu M, Kleiman L.** 2009. Roles of Gag and Ncp7 in Facilitating Trna(Lys)(3) Annealing to Viral Rna in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 83(16): 8099-107.

249. **Guo X, Roldan A, Hu J, Wainberg MA, Liang C.** 2005. Mutation of the Sp1 Sequence Impairs Both Multimerization and Membrane-Binding Activities of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag. *J Virol* 79(3): 1803-12.
250. **Gupta A, Singh G, Kaushik P, Joshi B, Kalra K, Chakraborty S.** 2013. Early Diagnosis of Hiv in Children Below 18 Months Using DNA Pcr Test--Assessment of the Effectiveness of Pmtct Interventions and Challenges in Early Initiation of Art in a Resource-Limited Setting. *J Trop Pediatr* 59(2): 120-6.
251. **Gupta RK, Hue S, Schaller T, Verschoor E, Pillay D, Towers GJ.** 2009. Mutation of a Single Residue Renders Human Tetherin Resistant to Hiv-1 Vpu-Mediated Depletion. *PLoS Pathog* 5(5): e1000443.
252. **Gupta S, Vingerhoets J, Fransen S, Tambuyzer L, Azijn H, Frantzell A, Paredes R, Coakley E, Nijs S, Clotet B, Petropoulos CJ, Schapiro J, Huang W, Picchio G.** 2011. Connection Domain Mutations in Hiv-1 Reverse Transcriptase Do Not Impact Etravirine Susceptibility and Virologic Responses to Etravirine-Containing Regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 55(6): 2872-9.
253. **Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L.** 1994. A New Subtype of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Mvp-5180) from Cameroon. *J Virol* 68(3): 1581-5.
254. **Guthrie BL, de Bruyn G, Farquhar C.** 2007. Hiv-1-Discordant Couples in Sub-Saharan Africa: Explanations and Implications for High Rates of Discordancy. *Curr HIV Res* 5(4): 416-29.
255. **Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M.** 1987. Genome Organization and Transactivation of the Human Immunodeficiency Virus Type 2. *Nature* 326(6114): 662-9.
256. **Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M.** 2000. Two Nuclear Localization Signals in the Hiv-1 Matrix Protein Regulate Nuclear Import of the Hiv-1 Pre-Integration Complex. *J Mol Biol* 299(2): 359-68.
257. **Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM.** 2000. Aids as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science* 287(5453): 607-14.
258. **Hales G, Birch C, Crowe S, Workman C, Hoy JF, Law MG, Kelleher AD, Lincoln D, Emery SobotCi.** 2006. A Randomised Trial Comparing Genotypic and Virtual Phenotypic Interpretation of Hiv. Drug Resistance: The Crest Study. *PLOS Clinical Trials* | e18.
259. **Hamel DJ, Sankale JL, Eisen 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(10): 1189-96.
260. **Hamers RL, Sigaloff KC, Kityo C, Mugenyi P, de Wit TF.** 2013. Emerging Hiv-1 Drug Resistance after Roll-out of Antiretroviral Therapy in Sub-Saharan Africa. *Curr Opin HIV AIDS* 8(1): 19-26.
261. **Harada S, Hazra R, Tamiya S, Zeichner SL, Mitsuya H.** 2007. Emergence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Containing the Q151m Complex in Children Receiving Long-Term Antiretroviral Chemotherapy. *Antiviral Res* 75(2): 159-66.
262. **Hare S, Di Nunzio F, Labeja A, Wang J, Engelman A, Cherepanov P.** 2009. Structural Basis for Functional Tetramerization of Lentiviral Integrase. *PLoS Pathog* 5(7): e1000515.
263. **Hargittai MR, Mangla AT, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K.** 2001. Hiv-1 Nucleocapsid Protein Zinc Finger Structures Induce Trna(Lys,3) Structural Changes but Are Not Critical for Primer/Template Annealing. *J Mol Biol* 312(5): 985-97.
264. **Harrigan PR, Salim M, Stammers DK, Wynhoven B, Brumme ZL, McKenna P, Larder B, Kemp SD.** 2002. A Mutation in the 3' Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase (Y318f) Associated with Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance. *J Virol* 76(13): 6836-40.
265. **Hauser A, Mugenyi K, Kabasinguzi R, Bluethgen K, Kuecherer C, Harms G, Kunz A.** 2009. Detection and Quantification of Minor Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Harboring K103n and Y181c Resistance Mutations in Subtype a and D Isolates by Allele-Specific Real-Time Pcr. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7): 2965-73.
266. **Hauser A, Sewangi J, Mbezi P, Dugange F, Lau I, Ziske J, Theuring S, Kuecherer C, Harms G, Kunz A.** 2012. Emergence of Minor Drug-Resistant Hiv-1 Variants after Triple Antiretroviral Prophylaxis for Prevention of Vertical Hiv-1 Transmission. *PLoS One* 7(2): e32055.

267. Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli JC, Cannon PM. 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env Counteract BST-2/Tetherin by Sequestration in a Perinuclear Compartment. *Retrovirology* 7:51.
268. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Karnasuta C, Suthent R, Liao HX, DeVico AL, Lewis GK, Williams C, Pinter A, Fong Y, Janes H, DeCamp A, Huang Y, Rao M, Billings E, Karasavvas N, Robb ML, Ngauy V, de Souza MS, Paris R, Ferrari G, Bailer RT, Soderberg KA, Andrews C, Berman PW, Frahm N, De Rosa SC, Alpert MD, Yates NL, Shen X, Koup RA, Pitisetthithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Kim JH. 2012. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *N Engl J Med* 366(14): 1275-86.
269. He Y, Xiao Y, Song H, Liang Q, Ju D, Chen X, Lu H, W. J, Jiang S, Zhang L. 2008. Design and Evaluation of Sifuvirtide, a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor. *J Biol Chem*. 283(17): 11126-1134.
270. Hemelaar J. 2012. The Origin and Diversity of the HIV-1 Pandemic. *Trends Mol Med* 18(3): 182-92.
271. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. 2011. Global Trends in Molecular Epidemiology of HIV-1 During 2000-2007. *AIDS* 25(5): 679-89.
272. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, Bridger G, Henson GW. 2000. Pharmacokinetics and Safety of Amd-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1667-73.
273. Heng X, Kharytonchyk S, Garcia EL, Lu K, Divakaruni SS, LaCotti C, Edme K, Telesnitsky A, Summers MF. 2012. Identification of a Minimal Region of the HIV-1 5'-Leader Required for RNA Dimerization, NC Binding, and Packaging. *J Mol Biol* 417(3): 224-39.
274. Henrich TJ, Kuritzkes DR. 2013. HIV-1 Entry Inhibitors: Recent Development and Clinical Use. *Curr Opin Virol* 3(1): 51-7.
275. Herbeck JT, Lyagoba F, Moore SW, Shindo N, Biryahwaho B, Kaleebu P, Mullins JI. 2007. Prevalence and Genetic Diversity of HIV Type 1 Subtypes A and D in Women Attending Antenatal Clinics in Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(5): 755-60.
276. Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, Hoffmann O, Maboko L, Birx DL, Mmbando D, McCutchan FE, Hoelscher M. 2006. Frequency of HIV Type 1 Dual Infection and HIV Diversity: Analysis of Low- and High-Risk Populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(7): 599-606.
277. Heslop OD, Smikle MF, Vickers IE, Christian NA, Harvey KM, Figueroa JP, Brown SE, Christie CD, Bain B, Barton EN. 2009. High Genetic Diversity in Human Immunodeficiency Virus-Type 1 in Jamaica. *West Indian Med J* 58(3): 195-200.
278. Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, Carrillo MG, Russi JC, Vinoles J, Alava A, Acosta ME, Gianella A, Andrade R, Sanchez JL, Carrion G, Russell K, Robb M, Birx D, McCutchan F, Carr JK. 2002. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(18): 1339-50.
279. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, Pillay D, Yeni PG, Jacobsen DM, Richman DD. 2008. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Top HIV Med* 16(3): 266-85.
280. Hoffman NG, Schiffer CA, Swanstrom R. 2003. Covariation of Amino Acid Positions in HIV-1 Protease. *Virology* 314(2): 536-48.
281. Hoffmann D, Schwarck D, Banning C, Brenner M, Mariyanna L, Krepstakies M, Schindler M, Millar DP, Hauber J. 2012. Formation of Trans-Activation Competent HIV-1 Rev:RRE Complexes Requires the Recruitment of Multiple Protein Activation Domains. *PLoS One* 7(6): e38305.
282. Holguin A, Gutierrez M, Portocarrero N, Rivas P, Baquero M. 2009. Performance of Oraquick Advance Rapid HIV-1/2 Antibody Test for Detection of Antibodies in Oral Fluid and Serum/Plasma in HIV-1+ Subjects Carrying Different HIV-1 Subtypes and Recombinant Variants. *J Clin Virol* 45(2): 150-2.
283. Holguin A, Lopez M, Molinero M, Soriano V. 2008. Performance of Three Commercial Viral Load Assays, Versant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA BdNA V3.0, Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HIV-1, and Nuclisens HIV-1 EasyQ V1.2, Testing HIV-1 Non-B Subtypes and Recombinant Variants. *J Clin Microbiol* 46(9): 2918-23.

284. **Hogg R, Lima V, Sterne JA, Grabar S, Battegay M, Bonarek M, D'Arminio Monforte A, Esteve A, Gill MJ, Harris R, Justice A, Hayden A, Lampe F, Mocroft A, Mugavero MJ, Staszewski S, Wasmuth JC, van Sighem A, Kitahata M, Guest J, Egger M, May M.** 2008. Life Expectancy of Individuals on Combination Antiretroviral Therapy in High-Income Countries: A Collaborative Analysis of 14 Cohort Studies. *Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Lancet* 372(9635): 293-9.
285. **Hosseinpour MC, Gupta RK, Van Zyl G, Eron JJ, Nachega JB.** 2013. Emergence of Hiv Drug Resistance During First- and Second-Line Antiretroviral Therapy in Resource-Limited Settings. *J Infect Dis* 207 Suppl 2 S49-56.
286. **Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO.** 1995. P6gag Is Required for Particle Production from Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Clones Expressing Protease. *J Virol* 69(11): 6810-8.
287. **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.** 2007. Coreceptor Tropism in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype D: High Prevalence of Cxcr4 Tropism and Heterogeneous Composition of Viral Populations. *J Virol* 81(15): 7885-93.
288. **Hugues SH.** 2001. Molecular Matchmaking : Nnrtis Can Enhance the Dimerization of Hiv 1 Reverse Transcriptase. . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 6991-92.
289. **Hussain A, Wesley C, Khalid M, Chaudhry A, Jameel S.** 2008. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Interacts with Cd74 and Modulates Major Histocompatibility Complex Class Ii Presentation. *J Virol* 82(2): 893-902.
290. **Huthoff H, Berkhout B.** 2001. Two Alternating Structures of the Hiv-1 Leader Rna. *RNA* 7(1): 143-57.
291. **Hyman ED.** 1988. A New Method of Sequencing DNA. *Anal Biochem* 174(2): 423-36.
292. **Imamichi H, Koita O, Dabitao D, Dao S, Ibrah M, Sogoba D, Dewar RL, Berg SC, Jiang MK, Parta M, Washington JA, Polis MA, Lane HC, Tounkara A.** 2009. Identification and Characterization of Crf02\_Ag, Crf06\_Cpx, and Crf09\_Cpx Recombinant Subtypes in Mali, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(1): 45-55.
293. **Imaz A, Garcia F, di Yacovo S, Llibre JM.** 2013. [Resistance Profile of Rilpivirine]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31 Suppl 2 36-43.
294. **Jacobs GB, Loxton AG, Laten A, Robson B, van Rensburg EJ, Engelbrecht S.** 2009. Emergence and Diversity of Different Hiv-1 Subtypes in South Africa, 2000-2001. *J Med Virol* 81(11): 1852-9.
295. **Jacobson JM, Lalezari JP, Thompson MA, Fichtenbaum CJ, Saag MS, Zingman BS, D'Ambrosio P, Stambler N, Rotshteyn Y, Marozsan AJ, Madden PJ, Morris SA, Olson WC.** 2010. Phase 2a Study of the Ccr5 Monoclonal Antibody Pro 140 Administered Intravenously to Hiv-Infected Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 54(10): 4137-42.
296. **Janssens W, Buve A, Nkengasong JN.** 1997. The Puzzle of Hiv-1 Subtypes in Africa. *AIDS* 11(6): 705-12.
297. **Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, Ndumbe PM, Delaporte E, Perret JL, Atende C, et al.** 1994. Genetic and Phylogenetic Analysis of Env Subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(7): 877-9.
298. **Jaskolski M, Alexandratos JN, Bujacz G, Wlodawer A.** 2009. Piecing Together the Structure of Retroviral Integrase, an Important Target in Aids Therapy. *FEBS J* 276(11): 2926-46.
299. **Javaugue FC, Recordon-Pinson P, Decoin M, Masquelier B, Cazanave C, Neau D, Dupon M, Ragnaud JM, Fleury HJ.** 2012. Molecular Characterization of Non-B Hiv Type 1 Isolates from Patients of a Department of Infectious Diseases, University Hospital of Bordeaux, France, 1989-2009. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(9): 1124-30.
300. **Jeffrey M.** 2009. Safety, Pharmacokinetics, and Antiretroviral Activity of Multiple Doses of Ibaluzimab (Formerly Tnx-355), an Anti-Cd4 Monoclonal Antibody, in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 53 450-7.
301. **Jeremiah F.** 2006. Human Immunodeficiency Virus Type1 Nef : Adapting to Intracellular Traffiking Patheways. . *Microbiol Mol Biol Rev* 70 (2): 548-63.

302. **Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP.** 2000. High Rate of Recombination Throughout the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome. *J Virol* 74(3): 1234-40.
303. **Ji H, Masse N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merks H, Graham M, Sandstrom P, Brooks J.** 2010. Hiv Drug Resistance Surveillance Using Pooled Pyrosequencing. *PLoS One* 5(2): e9263.
304. **Jiamsakul A, Kantor R, Li PC, Sirivichayakul S, Sirisanthana T, Kantipong P, Lee CK, Kamarulzaman A, Ratanasuwan W, Ditangco R, Singtoroj T, Sungkanuparph S.** 2012. Comparison of Predicted Susceptibility between Genotype and Virtual Phenotype Hiv Drug Resistance Interpretation Systems among Treatment-Naive Hiv-Infected Patients in Asia: Taser-M Cohort Analysis. *BMC Res Notes* 5 582.
305. **Johnson AA, Santos W, Pais GC, Marchand C, Amin R, Burke TR, Jr., Verdine G, Pommier Y.** 2006. Integration Requires a Specific Interaction of the Donor DNA Terminal 5'-Cytosine with Glutamine 148 of the Hiv-1 Integrase Flexible Loop. *J Biol Chem* 281(1): 461-7.
306. **Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Bennett D, Brant A, Cong ME, Spira T, Shafer RW, Heneine W.** 2007. Simple Pcr Assays Improve the Sensitivity of Hiv-1 Subtype B Drug Resistance Testing and Allow Linking of Resistance Mutations. *PLoS One* 2(7): e638.
307. **Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, D'Aquila RT, Demeter LM, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Telenti A, Richman DD.** 2003. Drug Resistance Mutations in Hiv-1. *Top HIV Med* 11(6): 215-21.
308. **Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD.** 2009. Update of the Drug Resistance Mutations in Hiv-1: December 2009. *Top HIV Med* 17(5): 138-45.
309. **Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer R, Wensing AM, Richman DD.** 2011. 2011 Update of the Drug Resistance Mutations in Hiv-1. *Top Antivir Med* 19(4): 156-64.
310. **Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Wensing AM, Richman DD.** 2013. Update of the Drug Resistance Mutations in Hiv-1: March 2013. *Top Antivir Med* 21(1): 6-14.
311. **John-Stewart GC, Nduati RW, Rousseau CM, Mbori-Ngacha DA, Richardson BA, Rainwater S, Panteleeff DD, Overbaugh J.** 2005. Subtype C Is Associated with Increased Vaginal Shedding of Hiv-1. *J Infect Dis* 192(3): 492-6.
312. **Jordan MR.** 2011. Assessments of Hiv Drug Resistance Mutations in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis* 52(8): 1058-60.
313. **Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD.** 2011. Visualizing Hiv-1 Assembly. *J Mol Biol* 410(4): 501-11.
314. **Kagulire SC, Stamper PD, Opindi P, Nakavuma JL, Mills LA, Makumbi F, Gray RH, Serwadda D, Reynolds SJ.** 2007. Performance of Two Commercial Immunochromatographic Assays for Rapid Detection of Antibodies Specific to Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2 in Serum and Urine Samples in a Rural Community-Based Research Setting (Rakai, Uganda). *Clin Vaccine Immunol* 14(6): 738-40.
315. **Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, Nakiyingi J, Rutebemberwa A, Morgan D, Weber J, Gilks C, Whitworth J.** 2002. Effect of Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Type 1 Envelope Subtypes a and D on Disease Progression in a Large Cohort of Hiv-1-Positive Persons in Uganda. *J Infect Dis* 185(9): 1244-50.
316. **Kameoka M, Morgan M, Binette M, Russell RS, Rong L, Guo X, Mouland A, Kleiman L, Liang C, Wainberg MA.** 2002. 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* 76(8): 3637-45.
317. **Kane CT, Diawara S, Ndiaye HD, Diallo PA, Wade AS, Diallo AG, Belec L, Mboup S.** 2009. Concentrated and Linked Epidemics of Both Hsv-2 and Hiv-1/Hiv-2 Infections in Senegal: Public Health Impacts of the Spread of Hiv. *Int J STD AIDS* 20(11): 793-6.
318. **Karasi JC, Dziezuk F, Quennery L, Forster S, Reischl U, Colucci G, Schoener D, Seguin-Devaux C, Schmit JC.** 2011. High Correlation between the Roche Cobas(R) Ampliprep/Cobas(R) Taqman(R) Hiv-1, V2.0 and the Abbott M2000 Realtime Hiv-1 Assays for Quantification of Viral Load in Hiv-1 B and Non-B Subtypes. *J Clin Virol* 52(3): 181-6.

319. **Karn J, Stoltzfus CM.** 2012. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Hiv-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(2): a006916.
320. **Kassu A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M, Ota F, Sugiura W.** 2007. Molecular Epidemiology of Hiv Type 1 in Treatment-Naive Patients in North Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(4): 564-8.
321. **Katz DA, Golden MR, Stekler JD.** 2012. Use of a Home-Use Test to Diagnose Hiv Infection in a Sex Partner: A Case Report. *BMC Res Notes* 5 440.
322. **Keele BF, 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.** 2006. Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic Hiv-1. *Science* 313(5786): 523-6.
323. **Kharsany AB, Mlotshwa M, Frohlich JA, Zuma NY, Samsunder N, Karim SS, Karim QA.** 2012. Hiv Prevalence among High School Learners - Opportunities for School-Based Hiv Testing Programmes and Sexual Reproductive Health Services. *World Health Popul* 13(4): 43-50.
324. **Kijak GH, McCutchan FE.** 2005. Hiv Diversity, Molecular Epidemiology, and the Role of Recombination. *Curr Infect Dis Rep* 7(6): 480-8.
325. **Kijak GH, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Watanaveeradej V, de Souza MS, Nelson KE, Ketsararat V, Gulgolarn V, Wera-arpachai M, Sriplienchan S, Khamboonrueng C, Birx DL, Robb ML, McCutchan FE.** 2007. Distinguishing Molecular Forms of Hiv-1 in Asia with a High-Throughput, Fluorescent Genotyping Assay, Mhabce V.2. *Virology* 358(1): 178-91.
326. **Killian MS, Vyas GN, Mehta R, Young K, Ebrahim O.** 2012. Possible Transmission of Human Immunodeficiency Virus-1 Infection from an Elite Controller to a Patient Who Progressed to Acquired Immunodeficiency Syndrome: A Case Report. *J Med Case Rep* 6(1): 291.
327. **Kimura M.** 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J Mol Evol* 16(2): 111-20.
328. **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.** 2004. Genetic Diversity of Hiv Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(12): 1352-7.
329. **Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, Eller LA, Eller M, Makumbi F, Birx D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Sewankambo NK, Quinn TC, Wawer M, Gray R.** 2008. Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Subtype on Disease Progression in Persons from Rakai, Uganda, with Incident Hiv-1 Infection. *J Infect Dis* 197(5): 707-13.
330. **Kiwanuka N, Robb M, Laeyendecker O, Kigozi G, Wabwire-Mangen F, Makumbi FE, Nalugoda F, Kagaayi J, Eller M, Eller LA, Serwadda D, Sewankambo NK, Reynolds SJ, Quinn TC, Gray RH, Wawer MJ, Whalen CC.** 2010. Hiv-1 Viral Subtype Differences in the Rate of Cd4+ T-Cell Decline among Hiv Seroincident Antiretroviral Naïve Persons in Rakai District, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54(2): 180-4.
331. **Kiwelu IE, Novitsky V, Margolin L, Baca J, Manongi R, Sam N, Shao J, McLane MF, Kapiga SH, Essex M.** 2012. Hiv-1 Subtypes and Recombinants in Northern Tanzania: Distribution of Viral Quasispecies. *PLoS One* 7(10): e47605.
332. **Kiwelu IE, Novitsky V, Margolin L, Baca J, Manongi R, Sam N, Shao J, McLane MF, Kapiga SH, Essex M.** 2013. Frequent Intra-Subtype Recombination among Hiv-1 Circulating in Tanzania. *PLoS One* 8(8): e71131.
333. **Kleiman L, Halwani R, Javanbakht H.** 2004. The Selective Packaging and Annealing of Primer Trnaly3 in Hiv-1. *Curr HIV Res* 2(2): 163-75.
334. **Koch WH, Sullivan PS, Roberts C, Francis K, Downing R, Mastro TD, Nkengasong J, Hu D, Masciotra S, Schable C, Lal RB.** 2001. Evaluation of United States-Licensed Human Immunodeficiency Virus Immunoassays for Detection of Group M Viral Variants. *J Clin Microbiol* 39(3): 1017-20.
335. **Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA.** 1992. Crystal Structure at 3.5 a Resolution of Hiv-1 Reverse Transcriptase Complexed with an Inhibitor. *Science* 256(5065): 1783-90.

336. **Kolchinsky P, Kiprilov E, Bartley P, Rubinstein R, Sodroski J.** 2001. 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* 75(7): 3435-43.
337. **Kolli M, Stawiski E, Chappéy C, Schiffer CA.** 2009. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease-Correlated Cleavage Site Mutations Enhance Inhibitor Resistance. *J Virol* 83(21): 11027-42.
338. **Kondo E, Mammano F, Cohen EA, Gottlinger HG.** 1995. The P6gag Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Sufficient for the Incorporation of Vpr into Heterologous Viral Particles. *J Virol* 69(5): 2759-64.
339. **Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T.** 2000. Timing the Ancestor of the Hiv-1 Pandemic Strains. *Science* 288(5472): 1789-96.
340. **Korenromp EL, Williams BG, Schmid GP, Dye C.** 2009. Clinical Prognostic Value of Rna Viral Load and Cd4 Cell Counts During Untreated Hiv-1 Infection--a Quantitative Review. *PLoS One* 4(6): e5950.
341. **Kosakovsky Pond SL, Smith DM.** 2009. Are All Subtypes Created Equal? The Effectiveness of Antiretroviral Therapy against Non-Subtype B Hiv-1. *Clin Infect Dis* 48(9): 1306-9.
342. **Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD.** 1995. Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains from Patients in Cyprus: Identification of a New Subtype Designated Subtype I. *J Virol* 69(10): 6122-30.
343. **Kostrikis LG, Shin S, Ho DD.** 1998. Genotyping Hiv-1 and Hcv Strains by a Combinatorial DNA Melting Assay (Coma). *Mol Med* 4(7): 443-53.
344. **Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeois 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(9): 1318-22.
345. **Kourteva Y, De Pasquale M, Allos T, McMunn C, D'Aquila RT.** 2012. Apobec3g Expression and Hypermutation Are Inversely Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Burden in Vivo. *Virology* 430(1): 1-9.
346. **Krausslich HG, Facke M, Heuser AM, Konvalinka J, Zentgraf H.** 1995. The Spacer Peptide between Human Immunodeficiency Virus Capsid and Nucleocapsid Proteins Is Essential for Ordered Assembly and Viral Infectivity. *J Virol* 69(6): 3407-19.
347. **Kuiken CL, Zwart G, Baan E, Coutinho RA, van den Hoek JA, Goudsmit J.** 1993. Increasing Antigenic and Genetic Diversity of the V3 Variable Domain of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Protein in the Course of the Aids Epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 9061-5.
348. **Kulkarni R, Babaoglu K, Lansdon EB, Rimsky L, Van Eygen V, Picchio G, Svarovskaia E, Miller MD, White KL.** 2012. The Hiv-1 Reverse Transcriptase M184i Mutation Enhances the E138k-Associated Resistance to Rilpivirine and Decreases Viral Fitness. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59(1): 47-54.
349. **Kuritzkes DR.** 2011. Drug Resistance in Hiv-1. *Curr Opin Virol* 1(6): 582-9.
350. **Lal RB, Chakrabarti S, Yang C.** 2005. Impact of Genetic Diversity of Hiv-1 on Diagnosis, Antiretroviral Therapy & Vaccine Development. *Indian J Med Res* 121(4): 287-314.
351. **Lama J, Mangasarian A, Trono D.** 1999. Cell-Surface Expression of Cd4 Reduces Hiv-1 Infectivity by Blocking Env Incorporation in a Nef- and Vpu-Inhibitable Manner. *Curr Biol* 9(12): 622-31.
352. **Lanier ER, Ait-Khaled M, Scott J, Stone C, Melby T, Sturge G, St Clair M, Steel H, Hetherington S, Pearce G, Spreen W, Lafon S.** 2004. Antiviral Efficacy of Abacavir in Antiretroviral Therapy-Experienced Adults Harboring Hiv-1 with Specific Patterns of Resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antivir Ther* 9(1): 37-45.
353. **Larrouy L, Brun-Vézinet F, Descamps D.** 2010. Mutations Au Niveau Des Sites De Clivage De Gag Et Du Changement De Cadre De Lecture Gag-Pol Du Vih-1 Et Réponse Virologique À Un Traitement Par Inhibiteurs De Protéase. *Virologie* 14(2): 119-28.
354. **Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ.** 2007. Natural Polymorphism of the Hiv-1 Integrase Gene and Mutations Associated with Integrase Inhibitor Resistance. *Antivir Ther* 12(4): 563-70.

355. **Latinovic O, Kuruppu J, Davis C, Le N, Heredia A.** 2009. Pharmacotherapy of Hiv-1 Infection: Focus on Ccr5 Antagonist Maraviroc. *Clin Med Ther* 1 1497-510.
356. **Laukkonen T, Albert J, Liitsola K, Green SD, Carr JK, Leitner T, McCutchan FE, Salminen MO.** 1999. Virtually Full-Length Sequences of Hiv Type 1 Subtype J Reference Strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(3): 293-7.
357. **Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, Mougnutou R, Seydi M, Gueye M, Liegeois F, Kane CT, Butel C, Mbuagbaw J, Zekeng L, Mboup S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M, Delaporte E.** 2002. No Difference in Clinical Progression between Patients Infected with the Predominant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Form (Crf) 02\_Ag Strain and Patients Not Infected with Crf02\_Ag, in Western and West-Central Africa: A Four-Year Prospective Multicenter Study. *J Infect Dis* 186(4): 486-92.
358. **Laurent C, Diakhate N, Gueye NF, Toure MA, Sow PS, Faye MA, Gueye M, Laniece I, Toure Kane C, Liegeois F, Vergne L, Mboup S, Badiane S, Ndoye I, Delaporte E.** 2002. The Senegalese Government's Highly Active Antiretroviral Therapy Initiative: An 18-Month Follow-up Study. *AIDS* 16(10): 1363-70.
359. **Laurent C, Ngom Gueye NF, Ndour CT, Gueye PM, Diouf M, Diakhate N, Toure Kane NC, Laniece I, Ndir A, Vergne L, Ndoye I, Mboup S, Sow PS, Delaporte E, Group AS.** 2005. Long-Term Benefits of Highly Active Antiretroviral Therapy in Senegalese Hiv-1-Infected Adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(1): 14-7.
360. **Le Rouzic E, Benichou S.** 2005. The Vpr Protein from Hiv-1: Distinct Roles Along the Viral Life Cycle. *Retrovirology* 2 11.
361. **Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, Benichou S.** 2002. Docking of Hiv-1 Vpr to the Nuclear Envelope Is Mediated by the Interaction with the Nucleoporin Hcg1. *J Biol Chem* 277(47): 45091-8.
362. **Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS.** 1999. Immunologic and Virologic Status after 14 to 18 Years of Infection with an Attenuated Strain of Hiv-1. A Report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 340(22): 1715-22.
363. **Lecossier D, Shulman NS, Morand-Joubert L, Shafer RW, Joly V, Zolopa AR, Clavel F, Hance AJ.** 2005. Detection of Minority Populations of Hiv-1 Expressing the K103n Resistance Mutation in Patients Failing Nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(1): 37-42.
364. **Lehmann M, Rocha S, Mangeat B, Blanchet F, Uji IH, Hofkens J, Piguet V.** 2011. Quantitative Multicolor Super-Resolution Microscopy Reveals Tetherin Hiv-1 Interaction. *PLoS Pathog* 7(12): e1002456.
365. **Leiman L, Halwani R, Javanbakht H.** 2004. The Selective Packaging and Annealing of Primer Trna3lys in Hiv-1. *Curr. HIV Res.* (2): 163-75.
366. **Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM.** 2003. Tracing the Origin and History of the Hiv-2 Epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6588-92.
367. **Lengruber RB, Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Baumann J, Santos AF, Pathak VK, Soares MA.** 2011. 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* 66(4): 702-8.
368. **Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS, Zhao J, Xu X, Williams-Diaz A, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, DiNubile MJ, Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P, investigators S.** 2009. Safety and Efficacy of Raltegravir-Based Versus Efavirenz-Based Combination Therapy in Treatment-Naive Patients with Hiv-1 Infection: A Multicentre, Double-Blind Randomised Controlled Trial. *Lancet* 374(9692): 796-806.
369. **Lenzi L, Wiens A, Pontarolo R.** 2013. Evaluation of Adverse Events Associated with Antiretroviral Therapy and the Relationship to Treatment Adherence. *Int J Clin Pharmacol Ther* 51(2): 141-6.
370. **Leroy V, Salmi LR, Dupon M, Sentilhes A, Texier-Maugein J, Dequae L, Dabis F, Salamon R.** 1997. Progression of Human Immunodeficiency Virus Infection in Patients with Tuberculosis Disease. A Cohort Study in Bordeaux, France, 1988-1994. The Groupe D'epidemiologie Clinique Du Sida En Aquitaine (Gecsa). *Am J Epidemiol* 145(4): 293-300.

371. **Leschonsky B, Ludwig C, Bieler K, Wagner R.** 2007. Capsid Stability and Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Are Influenced Critically by Charge and Size of Gag Residue 183. *J Gen Virol* 88(Pt 1): 207-16.
372. **Levin A, Hayouka Z, Helfer M, Brack-Werner R, Friedler A, Loyter A.** 2009. Peptides Derived from Hiv-1 Integrase That Bind Rev Stimulate Viral Genome Integration. *PLoS One* 4(1): e4155.
373. **Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.** 1996. Controlling Hiv Pathogenesis: The Role of the Noncytotoxic Anti-Hiv Response of Cd8+ T Cells. *Immunol Today* 17(5): 217-24.
374. **Leye N, Vidal N, Ndiaye O, Diop-Ndiaye H, Wade AS, Mboup S, Delaporte E, Toure-Kane C, Peeters M.** 2013. High Frequency of Hiv-1 Infections with Multiple Hiv-1 Strains in Men Having Sex with Men (Msm) in Senegal. *Infect Genet Evol* 20C 206-14.
375. **Li B, Stefano-Cole K, Kuhrt DM, Gordon SN, Else JG, Mulenga J, Allen S, Sodora DL, Silvestri G, Derdeyn CA.** 2010. Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection of Sooty Mangabeys Is Not Associated with High Levels of Autologous Neutralizing Antibodies. *J Virol* 84(12): 6248-53.
376. **Li L, Ben Y, Yuan S, Jiang S, Xu J, Zhang X.** 2012. Efficacy, Stability, and Biosafety of Sifuvirtide Gel as a Microbicide Candidate against Hiv-1. *PLoS One* 7(5): e37381.
377. **Li L, Chen L, Yang S, Liu Y, Li H, Bao Z, Wang Z, Zhuang D, Liu S, Li J.** 2010. Near Full-Length Genomic Characterization of a Novel Hiv Type 1 Subtype B/C Recombinant Strain from Yunnan, China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26(6): 711-6.
378. **Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY.** 2005. Roles of Hiv-1 Auxiliary Proteins in Viral Pathogenesis and Host-Pathogen Interactions. *Cell Res* 15(11-12): 923-34.
379. **Li WH, Tanimura M, Sharp PM.** 1988. Rates and Dates of Divergence between Aids Virus Nucleotide Sequences. *Mol Biol Evol* 5(4): 313-30.
380. **Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L, Cen S.** 2007. Apobec3g Inhibits DNA Strand Transfer During Hiv-1 Reverse Transcription. *J Biol Chem* 282(44): 32065-74.
381. **Liang C, Wainberg MA.** 2002. The Role of Tat in Hiv-1 Replication: An Activator and/or a Suppressor? *AIDS Rev* 4(1): 41-9.
382. **Lichterfeld M, Wöhrmann A, Schmeisser N, Fätkenheuer G, Salzberger B, Wyen C, Schmitz K, Sauerbruch T, Rockstroh JK.** 2003. Superior Virological Efficacy of Ritonavir-Boosted Protease Inhibitor Regimens Compared to Single Protease Inhibitor Therapy. *Eur J Med Res.* 8(2): 56-60.
383. **Liegeois F, Boue V, Butel C, Mouinga-Ondeme A, Sica J, Zamba C, Peeters M, Delaporte E, Rouet F.** 2013. Hiv Type-1 Group O Infection in Gabon: Low Prevalence Rate but Circulation of Genetically Diverse and Drug-Resistant Hiv Type-1 Group O Strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(7): 1085-90.
384. **Liegeois F, Reteno DG, Mouinga-Ondeme A, Sica J, Rouet F.** 2013. Short Communication: High Natural Polymorphism in the Gag Gene Cleavage Sites of Non-B Hiv Type 1 Isolates from Gabon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(8): 1179-82.
385. **Lihana RW, Ssemwanga D, Abimiku A, Ndembí N.** 2012. Update on Hiv-1 Diversity in Africa: A Decade in Review. *AIDS Rev* 14(2): 83-100.
386. **Linka M, Bruckova M, Maly M, Vandasova J, Stankova M, Reinis M.** 2008. A Study of Hiv-1 Genetic Diversity in the Czech Republic: 1986-2007. *Cent Eur J Public Health* 16(4): 175-7.
387. **Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD.** 2002. Antiretroviral-Drug Resistance among Patients Recently Infected with Hiv. *N Engl J Med* 347(6): 385-94.
388. **Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR.** 1996. Homozygous Defect in Hiv-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to Hiv-1 Infection. *Cell* 86(3): 367-77.
389. **Liu S, Wu S, Jiang S.** 2007. Hiv Entry Inhibitors Targeting Gp41: From Polypeptides to Small-Molecule Compounds. *Curr Pharm Des* 13(2): 143-62.
390. **Lô B, Philippon M, Cunin P, Meynard D, Tandia-Diagana M.** 1997 L'étiologie Microbienne Des Écoulements À Nouakchott, Mauritanie. *Bull Soc Pathol Exot* 90 (2): 81-2.
391. **Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcantara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, Rodrigues R, Grisard EC, Pinto AR.** 2007. Molecular Epidemiology of Hiv-1 in Santa Catarina State Confirms Increases of Subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol* 79(10): 1455-63.

392. **Locatelli S, Peeters M.** 2012. Cross-Species Transmission of Simian Retroviruses: How and Why They Could Lead to the Emergence of New Diseases in the Human Population. *AIDS* 26(6): 659-73.
393. **Lockett SF, Robertson JR, Brettle RP, Yap PL, Middleton D, Leigh Brown AJ.** 2001. Mismatched Human Leukocyte Antigen Alleles Protect against Heterosexual Hiv Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27(3): 277-80.
394. **Lorgeoux RP, Guo F, Liang C.** 2012. From Promoting to Inhibiting: Diverse Roles of Helicases in Hiv-1 Replication. *Retrovirology* 9 79.
395. **Louie B, Wong E, Klausner JD, Liska S, Hecht F, Dowling T, Obeso M, Phillips SS, Pandori MW.** 2008. Assessment of Rapid Tests for Detection of Human Immunodeficiency Virus-Specific Antibodies in Recently Infected Individuals. *J Clin Microbiol* 46(4): 1494-7.
396. **Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, Ingrand D, Saragosti S, Courouze AM, Brun-Vezinet F, Simon F.** 1994. Hiv-1/Hiv-2 Seronegativity in Hiv-1 Subtype O Infected Patients. *Lancet* 343(8910): 1393-4.
397. **Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet GM, Deleye R, et al.** 1993. Phylogenetic Analysis of Gag Genes from 70 International Hiv-1 Isolates Provides Evidence for Multiple Genotypes. *AIDS* 7(6): 769-80.
398. **Low A, Prada N, Topper M, Vaida F, Castor D, Mohri H, Hazuda D, Muesing M, Markowitz M.** 2009. Natural Polymorphisms of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and Inherent Susceptibilities to a Panel of Integrase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10): 4275-82.
399. **Loxton AG, Treurnicht F, Laten A, van Rensburg EJ, Engelbrecht S.** 2005. Sequence Analysis of near Full-Length Hiv Type 1 Subtype D Primary Strains Isolated in Cape Town, South Africa, from 1984 to 1986. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(5): 410-3.
400. **Lu J, Sista P, Giguel F, Greenberg M, Kuritzkes DR.** 2004. Relative Replicative Fitness of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Resistant to Enfuvirtide (T-20). *J Virol* 78(9): 4628-37.
401. **Lu K, Heng X, Garyu L, Monti S, Garcia EL, Kharytonchyk S, Dorjsuren B, Kulandaivel G, Jones S, Hiremath A, Divakaruni SS, LaCotti C, Barton S, Tummillo D, Hoscic A, Edme K, Albrecht S, Telesnitsky A, Summers MF.** 2011. Nmr Detection of Structures in the Hiv-1 5'-Leader Rna That Regulate Genome Packaging. *Science* 334(6053): 242-5.
402. **Lu R, Limon A, Devroe E, Silver PA, Cherepanov P, Engelman A.** 2004. Class Ii Integrase Mutants with Changes in Putative Nuclear Localization Signals Are Primarily Blocked at a Postnuclear Entry Step of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *J Virol* 78(23): 12735-46.
403. **Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ, Lynch D, Pilon AA, Hawley N, Kim JE, Chen Z, Montpetit M, Sanchez-Dardon J, Cohen EA, Badley AD.** 2003. Vpr R77q Is Associated with Long-Term Nonprogressive Hiv Infection and Impaired Induction of Apoptosis. *J Clin Invest* 111(10): 1547-54.
404. **Lyamuya EF, Aboud S, Urassa WK, Sufi J, Mbwana J, Ndugulile F, Massambu C.** 2009. Evaluation of Simple Rapid Hiv Assays and Development of National Rapid Hiv Test Algorithms in Dar Es Salaam, Tanzania. *BMC Infect Dis* 9 19.
405. **Lyseng-Williamson KA, Scott LJ.** 2012. Emtricitabine/Rilpivirine/Tenofovir Disoproxil Fumarate Single-Tablet Regimen: A Guide to Its Use in Hiv-1 Infection. *Clin Drug Investig* 32(10): 715-22.
406. **MacDonald KS, Embree J, Njenga S, Nagelkerke NJ, Ngatia I, Mohammed Z, Barber BH, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Plummer FA.** 1998. Mother-Child Class I Hla Concordance Increases Perinatal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *J Infect Dis* 177(3): 551-6.
407. **MacNeil A, Sarr AD, Sankale JL, Meloni ST, Mboup S, Kanki P.** 2007. Direct Evidence of Lower Viral Replication Rates in Vivo in Human Immunodeficiency Virus Type 2 (Hiv-2) Infection Than in Hiv-1 Infection. *J Virol* 81(10): 5325-30.
408. **Madrid R, Janvier K, Hitchin D, Day J, Coleman S, Noviello C, Bouchet J, Benmerah A, Guatelli J, Benichou S.** 2005. Nef-Induced Alteration of the Early/Recycling Endosomal Compartment Correlates with Enhancement of Hiv-1 Infectivity. *J Biol Chem* 280(6): 5032-44.

409. **Madruga JV, 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, group D-s.** 2007. 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* 370(9581): 29-38.
410. **Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strelbel K, Bonifacino JS.** 2010. Multilayered Mechanism of Cd4 Downregulation by Hiv-1 Vpu Involving Distinct Er Retention and Erad Targeting Steps. *PLoS Pathog* 6(4): e1000869.
411. **Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, Wolfram J, Richards N, Hanlon MH, Porter DJ, Wrin T, Parkin N, Tisdale M, Furfine E, Petropoulos C, Snowden BW, Kleim JP.** 2002. Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag at Positions L449 and P453 Are Linked to I50v Protease Mutants in Vivo and Cause Reduction of Sensitivity to Amprenavir and Improved Viral Fitness in Vitro. *J Virol* 76(15): 7398-406.
412. **Maiga AI, 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, Marcellin AG.** 2010. Resistance-Associated Mutations to Etravirine (Tmc-125) in Antiretroviral-Naive Patients Infected with Non-B Hiv-1 Subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 54(2): 728-33.
413. **Maiga AI, Fofana DB, Cisse M, Diallo F, Maiga MY, Traore HA, Maiga IA, Sylla A, Fofana D, Taiwo B, Murphy R, Katlama C, Tounkara A, Calvez V, Marcellin AG.** 2012. Characterization of Hiv-1 Antiretroviral Drug Resistance after Second-Line Treatment Failure in Mali, a Limited-Resources Setting. *J Antimicrob Chemother* 67(12): 2943-8.
414. **Maiga AI, Fofana DB, Maiga AC, Diallo F, Ait-Arkoub Z, Daou F, Cisse M, Sarro YD, Oumar AA, Sylla A, Katlama C, Taiwo B, Murphy R, Tounkara A, Marcellin AG, Calvez V.** 2013. -6. Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in Newly Hiv-Infected and Untreated Patients in Segou and Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(1): 182
415. **Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirden M, Tchertanov L, Peytavin G, Reynes J, Mouscadet JF, Katlama C, Calvez V, Marcellin AG.** 2008. Mutations Associated with Failure of Raltegravir Treatment Affect Integrase Sensitivity to the Inhibitor in Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1351-8.
416. **Malet I, Roquebert B, Dalban C, Wirden M, Amellal B, Agher R, Simon A, Katlama C, Costagliola D, Calvez V, Marcellin AG.** 2007. Association of Gag Cleavage Sites to Protease Mutations and to Virological Response in Hiv-1 Treated Patients. *J Infect* 54(4): 367-74.
417. **Malhotra S, Marwaha N, Saluja K.** 2013. Seroprevalence of Human Immunodeficiency Virus in North Indian Blood Donors Using Third and Fourth Generation Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Asian J Transfus Sci* 7(2): 125-9.
418. **Malim MH, Emerman M.** 2001. Hiv-1 Sequence Variation: Drift, Shift, and Attenuation. *Cell* 104(4): 469-72.
419. **Mamadou S, Hanki Y, Ali Maazou AR, Aoula B, Diallo S.** 2011. Genetic Diversity and Drug Resistance Mutations in Hiv-1 from Untreated Patients in Niamey, Niger. *ISRN Microbiol* 2011 797463.
420. **Mamadou S, Vidal N, Montavon C, Ben A, Djibo A, Rabiou S, Soga G, Delaporte E, Mboup S, Peeters M.** 2003. Emergence of Complex and Diverse Crf02-Ag/Crf06-Cpx Recombinant Hiv Type 1 Strains in Niger, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(1): 77-82.
421. **Mammano F, Petit C, Clavel F.** 1998. Resistance-Associated Loss of Viral Fitness in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Phenotypic Analysis of Protease and Gag Coevolution in Protease Inhibitor-Treated Patients. *J Virol* 72(9): 7632-7.
422. **Mansfield K, Lang SM, Gauduin MC, Sanford HB, Lifson JD, Johnson RP, Desrosiers RC.** 2008. Vaccine Protection by Live, Attenuated Simian Immunodeficiency Virus in the Absence of High-Titer Antibody Responses and High-Frequency Cellular Immune Responses Measurable in the Periphery. *J Virol* 82(8): 4135-48.
423. **Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S.** 2000. The Interaction of Vpr with Uracil DNA Glycosylase Modulates the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Vivo Mutation Rate. *J Virol* 74(15): 7039-47.

424. **Marcelin AG, Delaugerre C, Wirden M, Viegas P, Simon A, Katlama C, Calvez V.** 2004. Thymidine Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Profiles and Association to Other Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Observed in the Context of Virological Failure. *J Med Virol* 72(1): 162-5.
425. **Marcelin AG, 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, Group AARS.** 2010. Factors Associated with Virological Response to Etravirine in Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Experienced Hiv-1-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 54(1): 72-7.
426. **Marcelin AG, Flandre P, Pavie J, Schmidely N, Wirden M, Lada O, Chiche D, Molina JM, Calvez V, Team AIJS.** 2005. Clinically Relevant Genotype Interpretation of Resistance to Didanosine. *Antimicrob Agents Chemother* 49(5): 1739-44.
427. **Marcelin AG, Lamotte C, Delaugerre C, Ktorza N, Ait Mohand H, Cacace R, Bonmarchand M, Wirden M, Simon A, Bossi P, Bricaire F, Costagliola D, Katlama C, Peytavin G, Calvez V, Genophar Study G.** 2003. Genotypic Inhibitory Quotient as Predictor of Virological Response to Ritonavir-Amprenavir in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor-Experienced Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 47(2): 594-600.
428. **Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bember LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM.** 2005. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature* 437(7057): 376-80.
429. **Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al.** 1994. Reduced Rate of Disease Development after Hiv-2 Infection as Compared to Hiv-1. *Science* 265(5178): 1587-90.
430. **Marmor M, Sheppard HW, Donnell D, Bozeman S, Celum C, Buchbinder S, Koblin B, Seage GR, 3rd.** 2001. Homozygous and Heterozygous Ccr5-Delta32 Genotypes Are Associated with Resistance to Hiv Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27(5): 472-81.
431. **Marsh M, Helenius A.** 2006. Virus Entry: Open Sesame. *Cell* 124(4): 729-40.
432. **Martinez-Picado J, Wrin T, Frost SD, Clotet B, Ruiz L, Brown AJ, Petropoulos CJ, Parkin NT.** 2005. Phenotypic Hypersusceptibility to Multiple Protease Inhibitors and Low Replicative Capacity in Patients Who Are Chronically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 79(10): 5907-13.
433. **Masharsky AE, Dukhovlinova EN, Verevochkin SV, Toussova OV, Skochilov RV, Anderson JA, Hoffman I, Cohen MS, Swanstrom R, Kozlov AP.** 2010. A Substantial Transmission Bottleneck among Newly and Recently Hiv-1-Infected Injection Drug Users in St Petersburg, Russia. *J Infect Dis* 201(11): 1697-702.
434. **Masquelier B, Race E, Tamalet C, Descamps D, Izopet J, Buffet-Janvresse C, Ruffault A, Mohammed AS, Cottalorda J, Schmuck A, Calvez V, Dam E, Fleury H, Brun-Vezinet F, SIDA AARsgFANdRsl.** 2001. Genotypic and Phenotypic Resistance Patterns of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with Insertions or Deletions in the Reverse Transcriptase (Rt): Multicenter Study of Patients Treated with Rt Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6): 1836-42.
435. **Mateu MG.** 2009. The Capsid Protein of Human Immunodeficiency Virus: Intersubunit Interactions During Virus Assembly. *FEBS J* 276(21): 6098-109.
436. **Mathias AA, German P, Murray BP, Wei L, Jain A, West S, Warren D, Hui J, Kearney BP.** 2010. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Gs-9350: A Novel Pharmacokinetic Enhancer without Anti-Hiv Activity. *Clin Pharmacol Ther* 87(3): 322-9.

437. Matusali G, Potesta M, Santoni A, Cerboni C, Doria M. 2012. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef and Vpu Proteins Downregulate the Natural Killer Cell-Activating Ligand Pvr. *J Virol* 86(8): 4496-504.
438. Mbisa JL, Gupta RK, Kabamba D, Mulenga V, Kalumbi M, Chintu C, Parry CM, Gibb DM, Walker SA, Cane PA, Pillay D. 2011. The Evolution of Hiv-1 Reverse Transcriptase in Route to Acquisition of Q151m Multi-Drug Resistance Is Complex and Involves Mutations in Multiple Domains. *Retrovirology* 8 31.
439. Mbisa JL, Martin SA, Cane PA. 2011. Patterns of Resistance Development with Integrase Inhibitors in Hiv. *Infect Drug Resist* 4 65-76.
440. McCarthy M. 2003. Aids Vaccine Fails in Thai Trial. *Lancet* 362(9397): 1728.
441. McColl DJ, Chappéy C, Parkin NT, Miller MD. 2008. Prevalence, Genotypic Associations and Phenotypic Characterization of K65r, L74v and Other Hiv-1 Rt Resistance Mutations in a Commercial Database. *Antivir Ther* 13(2): 189-97.
442. McColl DJ, Chen X. 2010. Strand Transfer Inhibitors of Hiv-1 Integrase: Bringing in a New Era of Antiretroviral Therapy. *Antiviral Res* 85(1): 101-18.
443. McCutchan FE, 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. 1996. Diversity of the Envelope Glycoprotein among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates of Clade E from Asia and Africa. *J Virol* 70(6): 3331-8.
444. McDermott AB, Koup RA. 2012. Cd8(+) T Cells in Preventing Hiv Infection and Disease. *AIDS* 26(10): 1281-92.
445. McKinnon LR, Ball TB, Kimani J, Wachihi C, Matu L, Luo M, Embree J, Fowke KR, Plummer FA. 2005. Cross-Clade Cd8(+) T-Cell Responses with a Preference for the Predominant Circulating Clade. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40(3): 245-9.
446. Melby T, Sista P, DeMasi R, Kirkland T, Roberts N, Salgo M, Heilek-Snyder G, Cammack N, Matthews TJ, Greenberg ML. 2006. Characterization of Envelope Glycoprotein Gp41 Genotype and Phenotypic Susceptibility to Enfuvirtide at Baseline and on Treatment in the Phase Iii Clinical Trials Toro-1 and Toro-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(5): 375-85.
447. Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS. 2000. Evidence That the Transition of Hiv-1 Gp41 into a Six-Helix Bundle, Not the Bundle Configuration, Induces Membrane Fusion. *J Cell Biol* 151(2): 413-23.
448. Meloni ST, Kim B, Sankale JL, Hamel DJ, Tovanabutra S, Mboup S, McCutchan FE, Kanki PJ. 2004. Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype a Virus Circulating in West Africa: Sub-Subtype A3. *J Virol* 78(22): 12438-45.
449. Meloni ST, Sankale JL, Hamel DJ, Eisen G, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Kanki PJ. 2004. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Sub-Subtype A3 in Senegal from 1988 to 2001. *J Virol* 78(22): 12455-61.
450. Meng Z, Xin R, Zhong P, Zhang C, Abubakar YF, Li J, Liu W, Zhang X, Xu J. 2012. A New Migration Map of Hiv-1 Crf07\_Bc in China: Analysis of Sequences from 12 Provinces over a Decade. *PLoS One* 7(12): e52373.
451. Merati TP, Ryan CE, Spelman T, Wirawan DN, Bakta IM, Otto B, Oelrichs RB, Crowe SM. 2012. Crf01\_Ae Dominates the Hiv-1 Epidemic in Indonesia. *Sex Health* 9(5): 414-21.
452. Messiaen P, Wensing AM, Fun A, Nijhuis M, Brusselaers N, Vandekerckhove L. 2013. Clinical Use of Hiv Integrase Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 8(1): e52562.
453. Messou E, Chaix ML, Gabillard D, Yapo V, Toni TD, Minga A, Kouakou MG, Ouattara E, Rouzioux C, Danel C, Eholie SP, Anglaret X. 2013. Increasing Rate of Tams and Etravirine Resistance in Hiv-1-Infected Adults between 12 and 24 Months of Treatment: The Voltart Cohort Study in Cote D'Ivoire, West Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 64(2): 211-9.
454. Metfiot M, Marchand C, Maddali K, Pommier Y. 2010. Resistance to Integrase Inhibitors. *Viruses* 2(7): 1347-66.
455. Metzker ML. 2010. Sequencing Technologies - the Next Generation. *Nat Rev Genet* 11(1): 31-46.
456. Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zollner B, Jessen H, Schewe K, Fenske S, Gellermann H, Stellbrink HJ. 2005. Detection of Minor Populations of Drug-Resistant Hiv-1 in Acute Seroconverters. *AIDS* 19(16): 1819-25.

457. **Meuwissen PJ, Stolt B, Iannucci V, Vermeire J, Naessens E, Saksela K, Geyer M, Vanham G, Arien KK, Fackler OT, Verhasselt B.** 2012. Identification of a Highly Conserved Valine-Glycine-Phenylalanine Amino Acid Triplet Required for Hiv-1 Nef Function. *Retrovirology* 934.
458. **Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB.** 1994. The Human Immunodeficiency Virus-1 Nef Gene Product: A Positive Factor for Viral Infection and Replication in Primary Lymphocytes and Macrophages. *J Exp Med* 179(1): 101-13.
459. **Mishra V, Vaessen M, Boerma JT, Arnold F, Way A, Barrere B, Cross A, Hong R, Sangha J.** 2006. Hiv Testing in National Population-Based Surveys: Experience from the Demographic and Health Surveys. *Bull World Health Organ* 84(7): 537-45.
460. **Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S.** 2010. Uncoating of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires Prolyl Isomerase Pin1. *J Biol Chem* 285(33): 25185-95.
461. **Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD.** 2004. Retroviral DNA Integration: Aslv, Hiv, and Mlv Show Distinct Target Site Preferences. *PLoS Biol* 2(8): E234.
462. **Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC.** 2009. Vpu Antagonizes Bst-2-Mediated Restriction of Hiv-1 Release Via Beta-Trcp and Endo-Lysosomal Trafficking. *PLoS Pathog* 5(5): e1000450.
463. **Mmbaga EJ, Leyna GH, Mnyika KS, Klepp KI.** 2009. Comparison of Hiv-1 Prevalence and Risk Factors between Pregnant, Non-Pregnant, All Women and the General Population in Tanzania: Implications for Second-Generation Surveillance. *Int J STD AIDS* 20(7): 483-8.
464. **Mohamad S, Deris ZZ, Yusoff NK, Ariffin TA, Shueb RH.** 2012. Assessing Subtypes and Drug Resistance Mutations among Hiv-1 Infected Children Who Failed Antiretroviral Therapy in Kelantan, Malaysia. *Braz J Infect Dis* 16(3): 284-8.
465. **Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ.** 1998. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to Hela Cd4 Cells Is Cd4 Independent and Gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans. *J Virol* 72(5): 3623-34.
466. **Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, Boillet F, Peeters M.** 2009. Evaluation of Different Rna Extraction Methods and Storage Conditions of Dried Plasma or Blood Spots for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rna Quantification and Pcr Amplification for Drug Resistance Testing. *J Clin Microbiol* 47(4): 1107-18.
467. **Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M.** 1997. Divergent Transcriptional Regulation among Expanding Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes. *J Virol* 71(11): 8657-65.
468. **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.** 2000. 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* 23(5): 363-74.
469. **Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK.** 2008. 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* 72(1): 54-84, table of contents.
470. **Mooij SH, van der Klis FR, van der Sande MA, Schepp RM, Speksnijder AG, Bogaards JA, de Melker HE, de Vries HJ, Snijders PJ, van der Loeff MF.** 2013. Seroepidemiology of High-Risk Hpv in Hiv-Negative and Hiv-Infected Msm: The H2m Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(10): 1698-708.
471. **Moore JP.** 1997. Coreceptors: Implications for Hiv Pathogenesis and Therapy. *Science* 276(5309): 51-52.
472. **Moore MD, Fu W, Nikolaitchik O, Chen J, Ptak RG, Hu WS.** 2007. Dimer Initiation Signal of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Its Role in Partner Selection During Rna Copackaging and Its Effects on Recombination. *J Virol* 81(8): 4002-11.
473. **Morillo Verdugo R, Abdel-Kader Martín L, Márquez Saavedra E, Martínez Alonso I, Artacho Criado S, Almeida González C, Miguel Del Corral M.** 2005 An Analisys Fo Causes for the Discontinuation of a Simplified Antiretroviral Regimen with Abacavir, Lamivudine and Zidovudine. *Farm Hosp.* 29(3):164-70.

474. **Mouinga-Ondeme A, Mabika-Mabika A, Alalade P, Mongo AD, Sica J, Liegeois F, Rouet F.** 2013. Significant Impact of Non-B Hiv-1 Variants Genetic Diversity in Gabon on Plasma Hiv-1 Rna Quantitation. *J Med Virol*.
475. **Moyle G.** 2003. Stopping Hiv Fusion with Enfuvirtide: The First Step to Extracellular Haart. *J Antimicrob Chemother* 51(2): 213-7.
476. **Moyle G, DeJesus E, Boffito M, Wong RS, Gibney C, Badel K, MacFarland R, Calandra G, Bridger G, Becker S.** 2009. Proof of Activity with Amd11070, an Orally Bioavailable Inhibitor of Cxcr4-Tropic Hiv Type 1. *Clin Infect Dis* 48(6): 798-805.
477. **Moyle GJ, DeJesus E, Cahn P, Castillo SA, Zhao H, Gordon DN, Craig C, Scott TR.** 2005. Abacavir Once or Twice Daily Combined with Once-Daily Lamivudine and Efavirenz for the Treatment of Antiretroviral-Naive Hiv-Infected Adults: Results of the Ziagen Once Daily in Antiretroviral Combination Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(4): 417-25.
478. **Mulky A, Kappes JC.** 2005. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Subunit Structure/Function in the Context of Infectious Virions and Human Target Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 49(9): 3762-9.
479. **Mumtaz G, Hilmi N, Akala FA, Semini I, Riedner G, Wilson D, Abu-Raddad LJ.** 2011. Hiv-1 Molecular Epidemiology Evidence and Transmission Patterns in the Middle East and North Africa. *Sex Transm Infect* 87(2): 101-6.
480. **Murakami T.** 2012. Retroviral Env Glycoprotein Trafficking and Incorporation into Virions. *Mol Biol Int* 2012 682850.
481. **Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y.** 2004. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env-Mediated Membrane Fusion by Viral Protease Activity. *J Virol* 78(2): 1026-31.
482. **Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N.** 2009. The Novel Cxcr4 Antagonist Krh-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with Amd3100. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7): 2940-8.
483. **Murillo W, Veras N, Prosperi M, de Rivera IL, Paz-Bailey G, Morales-Miranda S, Juarez SI, Yang C, Devos J, Marin JP, Mild M, Albert J, Salemi M.** 2013. A Single Early Introduction of Hiv-1 Subtype B into Central America Accounts for Most Current Cases. *J Virol* 87(13): 7463-70.
484. **Muwonga J, Edidi S, Butel C, Vidal N, Monleau M, Okenge A, Mandjo JL, Mukumbi H, Muyembe JJ, Mbayo F, Nzongola DK, Delaporte E, Boillot F, Peeters M.** 2011. Resistance to Antiretroviral Drugs in Treated and Drug-Naive Patients in the Democratic Republic of Congo. *J Acquir Immune Defic Syndr* 57 Suppl 1 S27-33.
485. **Nair V, Chi G.** 2007. Hiv Integrase Inhibitors as Therapeutic Agents in Aids. *Rev Med Virol* 17(4): 277-95.
486. **Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos SG, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M.** 2009. Sc29ek, a Peptide Fusion Inhibitor with Enhanced Alpha-Helicity, Inhibits Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Resistant to Enfuvirtide. *Antimicrob Agents Chemother* 53(3): 1013-8.
487. **Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM.** 2002. Genetic Recombination and Its Role in the Development of the Hiv-1 Pandemic. *AIDS* 16 Suppl 4 S3-16.
488. **Nasioulas G, Paraskevis D, Magiorkinis E, Theodoridou M, Hatzakis A.** 1999. Molecular Analysis of the Full-Length Genome of Hiv Type 1 Subtype I: Evidence of a/G/I Recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(8): 745-58.
489. **Nathans R, Chu CY, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM.** 2009. Cellular Microrna and P Bodies Modulate Host-Hiv-1 Interactions. *Mol Cell* 34(6): 696-709.
490. **Navare AT, Sova P, Purdy DE, Weiss JM, Wolf-Yadlin A, Korth MJ, Chang ST, Proll SC, Jahan TA, Krasnoselsky AL, Palermo RE, Katze MG.** 2012. Quantitative Proteomic Analysis of Hiv-1 Infected Cd4+ T Cells Reveals an Early Host Response in Important Biological Pathways: Protein Synthesis, Cell Proliferation, and T-Cell Activation. *Virology* 429(1): 37-46.

491. Nazziwa J, Njai HF, Ndembí N, Birungi J, Lyagoba F, Gershim A, Nakiyingi-Miyo J, Nielsen L, Mpendo J, Nanvubya A, Debont J, Grosskurth H, Kamali A, Seeley J, Kaleebu P. 2013. Short Communication: Hiv Type 1 Transmitted Drug Resistance and Evidence of Transmission Clusters among Recently Infected Antiretroviral-Naive Individuals from Ugandan Fishing Communities of Lake Victoria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(5): 788-95.
492. Ndongmo CB, Pieniazek D, Holberg-Petersen M, Holm-Hansen C, Zekeng L, Jeansson SL, Kaptue L, Kalish ML. 2006. Hiv Genetic Diversity in Cameroon: Possible Public Health Importance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(8): 812-6.
493. Ndung'u T, Weiss RA. 2012. On Hiv Diversity. *AIDS* 26(10): 1255-60.
494. 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. 2010. Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Gorillas. *J Virol* 84(3): 1464-76.
495. Nei M. 1996. Phylogenetic Analysis in Molecular Evolutionary Genetics. *Annu Rev Genet* 30: 371-403.
496. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin Inhibits Retrovirus Release and Is Antagonized by Hiv-1 Vpu. *Nature* 451(7177): 425-30.
497. Neogi U, Gupta S, Rodridges R, Sahoo PN, Rao SD, Rewari BB, Shastri S, Costa AD, Shet A. 2012. Dried Blood Spot Hiv-1 Rna Quantification: A Useful Tool for Viral Load Monitoring among Hiv-Infected Individuals in India. *Indian J Med Res* 136(6): 956-62.
498. Neogi U, Sood V, Ronsard L, Singh J, Lata S, Ramachandran VG, Das S, Wanchu A, Banerjea AC. 2011. Genetic Architecture of Hiv-1 Genes Circulating in North India & Their Functional Implications. *Indian J Med Res* 134(6): 769-78.
499. Ng BE, Butler LM, Horvath T, Rutherford GW. 2011. Population-Based Biomedical Sexually Transmitted Infection Control Interventions for Reducing Hiv Infection. *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD001220.
500. Nguyen AT, Feasley CL, Jackson KW, Nitz TJ, Salzwedel K, Air GM, Sakalian M. 2011. The Prototype Hiv-1 Maturation Inhibitor, Bevirimat, Binds to the Ca-Sp1 Cleavage Site in Immature Gag Particles. *Retrovirology* 8: 101.
501. Nguyen HT, Duc NB, Shrivastava R, Tran TH, Nguyen TA, Thang PH, McNicholl JM, Leelawiwat W, Chonwattana W, Sidibe K, Fujita M, Luu CM, Kakkar R, Bennett DE, Kaplan J, Cosimi L, Wolfe MI. 2008. Hiv Drug Resistance Threshold Survey Using Specimens from Voluntary Counselling and Testing Sites in Hanoi, Vietnam. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 115-21.
502. Ni XJ, Delelis O, Charpentier C, Storto A, Collin G, Diamond F, Descamps D, Mouscadet JF. 2011. G140s/Q148r and N155h Mutations Render Hiv-2 Integrase Resistant to Raltegravir Whereas Y143c Does Not. *Retrovirology* 8: 68.
503. Nishizawa M, Hattori J, Shiino T, Matano T, Heneine W, Johnson JA, Sugiura W. 2013. Highly-Sensitive Allele-Specific Pcr Testing Identifies a Greater Prevalence of Transmitted Hiv Drug Resistance in Japan. *PLoS One* 8(12): e83150.
504. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, Rovenska M, de Jong D, Chappay C, Goedegebuure IW, Heilek-Snyder G, Dulude D, Cammack N, Brakier-Gingras L, Konvalinka J, Parkin N, Krausslich HG, Brun-Vezinet F, Boucher CA. 2007. A Novel Substrate-Based Hiv-1 Protease Inhibitor Drug Resistance Mechanism. *PLoS Med* 4(1): e36.
505. Nisole S, Saib A. 2004. Early Steps of Retrovirus Replicative Cycle. *Retrovirology* 1: 9.
506. Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, Iijima S, Yoneda Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Aida Y. 2007. Novel Nuclear Import of Vpr Promoted by Importin Alpha Is Crucial for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Macrophages. *J. Virol.* 81(10): 5284-93.
507. Novitsky V, Ndung'u T, Wang R, Bussmann H, Chonco F, Makhema J, De Gruttola V, Walker BD, Essex M. 2011. Extended High Viremics: A Substantial Fraction of Individuals Maintain High Plasma Viral Rna Levels after Acute Hiv-1 Subtype C Infection. *AIDS* 25(12): 1515-22.
508. Nowotny M. 2009. Retroviral Integrase Superfamily: The Structural Perspective. *EMBO Rep* 10(2): 144-51.

509. Nyamache AK, Muigai AW, Khamadi SA. 2013. Circulating Trends of Non-B Hiv Type 1 Subtypes among Kenyan Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(2): 400-3.
510. Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI, Bjune G, Muller F. 2008. Prevalence of Reverse Transcriptase and Protease Mutations Associated with Antiretroviral Drug Resistance among Drug-Naive Hiv-1 Infected Pregnant Women in Kagera and Kilimanjaro Regions, Tanzania. *AIDS Res Ther* 5 13.
511. Nyombi BM, Kristiansen KI, Bjune G, Muller F, Holm-Hansen C. 2008. Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes in Kagera and Kilimanjaro Regions, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(6): 761-9.
512. Ono A. 2009. Hiv-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future Virol* 4(3): 241-57.
513. Ott DE, Coren LV, Gagliardi TD. 2005. Redundant Roles for Nucleocapsid and Matrix Rna-Binding Sequences in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J Virol* 79(22): 13839-47.
514. Owen SM. 2012. Testing for Acute Hiv Infection: Implications for Treatment as Prevention. *Curr Opin HIV AIDS* 7(2): 125-30.
515. Owen SM, Yang C, Spira T, Ou CY, Pau CP, Parekh BS, Candal D, Kuehl D, Kennedy MS, Rudolph D, Luo W, Delatorre N, Masciotra S, Kalish ML, Cowart F, Barnett T, Lal R, McDougal JS. 2008. Alternative Algorithms for Human Immunodeficiency Virus Infection Diagnosis Using Tests That Are Licensed in the United States. *J Clin Microbiol* 46(5): 1588-95.
516. Oxford JS, Coates AR, Sia DY, Brown K, Asad S. 1989. Potential Target Sites for Antiviral Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus (Hiv). *J Antimicrob Chemother* 23 Suppl A 9-27.
517. Oyomopito RA, Li PC, Sungkanuparph S, Phanuphak P, Tee KK, Sirisanthana T, Kantipong P, Oka S, Lee CK, Kamarulzaman A, Choi JY, Sohn AH, Law M, Chen YM. 2012. Evaluating Immunologic Response and Clinical Deterioration in Treatment-Naive Patients Initiating First-Line Therapies Infected with Hiv-1 Crf01\_Ae and Subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*.
518. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. 1998. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. Hiv Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338(13): 853-60.
519. 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. 2005. Multiple, Linked Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Treatment-Experienced Patients Are Missed by Standard Genotype Analysis. *J Clin Microbiol* 43(1): 406-13.
520. Pan C, Cai L, Lu H, Qi Z, Jiang S. 2009. Combinations of the First and Next Generations of Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Fusion Inhibitors Exhibit a Highly Potent Synergistic Effect against Enfuvirtide- Sensitive and -Resistant Hiv Type 1 Strains. *J Virol* 83(16): 7862-72.
521. Pan C, Lu H, Qi Z, Jiang S. 2009. Synergistic Efficacy of Combination of Enfuvirtide and Sifuvirtide, the First and Next Generation Hiv Fusion Inhibitors. *AIDS* 23(5): 639-41.
522. Pan C, Lu H, Qi Z, Jiang S. 2009. Synergistic Efficacy of Combination of Enfuvirtide and Sifuvirtide, the First- and Next-Generation Hiv-Fusion Inhibitors. *AIDS* 23(5): 639-41.
523. Pan P, Tao X, Zhang Q, Xing W, Sun X, Pei L, Jiang Y. 2007. Clinical Comparison of Branched DNA and Reverse Transcriptase-Pcr and Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay for the Quantitation of Circulating Recombinant Form\_Bc Hiv-1 Rna in Plasma. *AIDS* 21 Suppl 8 S27-32.
524. Pancera M. 2005. Structure, Fonction Et Antigénicité Des Glycoprotéines D'enveloppe Du Virus De L'immunodéficience Humaine De Type 1 (Vih1). *Virologie* 9 457-72.
525. Pandrea I, Robertson DL, Onanga R, Gao F, Makwua M, Ngari P, Bedjabaga I, Roques P, Simon F, Apetrei C. 2002. Analysis of Partial Pol and Env Sequences Indicates a High Prevalence of Hiv Type 1 Recombinant Strains Circulating in Gabon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(15): 1103-16.
526. Parekh BS, Anyanwu J, Patel H, Downer M, Kalou M, Gichimu C, Keipkerich BS, Clement N, Omundi M, Mayer O, Ou CY, Nkengasong JN. 2010. Dried Tube Specimens: A Simple and Cost-Effective Method for Preparation of Hiv Proficiency Testing Panels and Quality Control Materials for Use in Resource-Limited Settings. *J Virol Methods* 163(2): 295-300.

527. **Park J, Morrow CD.** 1993. Mutations in the Protease Gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Affect Release and Stability of Virus Particles. *Virology* 194(2): 843-50.
528. **Parkin NT, Gupta S, Chappay C, Petropoulos CJ.** 2006. The K101p and K103r/V179d Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confer Resistance to Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 50(1): 351-4.
529. **Parkin NT, Schapiro JM.** 2004. Antiretroviral Drug Resistance in Non-Subtype B Hiv-1, Hiv-2 and Siv. *Antivir Ther* 9(1): 3-12.
530. **Parris GE.** 2007. How Did the Ancestral Hiv-1 Group M Retrovirus Get to Leopoldville from Southeastern Cameroon? *Med Hypotheses* 69(5): 1098-101.
531. **Parry CM, Kohli A, Boinett CJ, Towers GJ, McCormick AL, Pillay D.** 2009. Gag Determinants of Fitness and Drug Susceptibility in Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 83(18): 9094-101.
532. **Parry JV, Mortimer PP, Perry KR, Pillay D, Zuckerman M.** 2003. Towards Error-Free Hiv Diagnosis: Guidelines on Laboratory Practice. *Commun Dis Public Health* 6(4): 334-50.
533. **Pascoe SJ, Langhaug LF, Mudzori J, Burke E, Hayes R, Cowan FM.** 2009. Field Evaluation of Diagnostic Accuracy of an Oral Fluid Rapid Test for Hiv, Tested at Point-of-Service Sites in Rural Zimbabwe. *AIDS Patient Care STDS* 23(7): 571-6.
534. **Patel P, Bennett B, Sullivan T, Parker MM, Heffelfinger JD, Sullivan PS.** 2012. Rapid Hiv Screening: Missed Opportunities for Hiv Diagnosis and Prevention. *J Clin Virol* 54(1): 42-7.
535. **Peeters M, Chaix M.** 2013. Origine Et Diversité Génétique Du Virus De L'immunodéficience Humaine : D'où Vient-Il, Où Va-T-Il ?. *Virologie* 17 (3): 119-31.
536. **Peeters M, Chaix ML, Delaporte E.** 2008. [Genetic Diversity and Phylogeographic Distribution of Siv: How to Understand the Origin of Hiv]. *Med Sci (Paris)* 24(6-7): 621-8.
537. **Peeters M, Fransen K, Delaporte E, Van den Haesevelde M, Gershy-Damet GM, Kestens L, van der Groen G, Piot P.** 1992. Isolation and Characterization of a New Chimpanzee Lentivirus (Simian Immunodeficiency Virus Isolate Cpz-Ant) from a Wild-Captured Chimpanzee. *AIDS* 6(5): 447-51.
538. **Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, Bussi P, Cooper RW, Delaporte E.** 1989. Isolation and Partial Characterization of an Hiv-Related Virus Occurring Naturally in Chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3(10): 625-30.
539. **Peeters M, Jung M, Ayouba A.** 2013. The Origin and Molecular Epidemiology of Hiv. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11(9): 885-96.
540. **Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN.** 2003. Genetic Diversity of Hiv in Africa: Impact on Diagnosis, Treatment, Vaccine Development and Trials. *AIDS* 17(18): 2547-60.
541. **Pere H, Charpentier C, Mbelesso P, Dandy M, Matta M, Moussa S, De Dieu Longo J, Gresenguet G, Abraham B, Belec 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(4): 315-23.
542. **Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, Walker BD, Ripke S, Brumme CJ, Pultit SL, Carrington M, Kadie CM, Carlson JM, Heckerman D, Graham RR, Plenge RM, Deeks SG, Gianniny L et coll.** 2010. The Major Genetic Determinants of Hiv-1 Control Affect Hla Class I Peptide Presentation. *Science* 330(6010): 1551-7.
543. **Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD.** 2009. Tetherin Inhibits Hiv-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell* 139(3): 499-511.
544. **Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ.** 1993. A Cooperative Interaction between Nf-Kappa B and Sp1 Is Required for Hiv-1 Enhancer Activation. *EMBO J* 12(9): 3551-8.
545. **Permpalung N, Putcharoen O, Avihingsanon A, Ruxrungtham K.** 2012. Treatment of Hiv Infection with Once-Daily Regimens. *Expert Opin Pharmacother* 13(16): 2301-17.
546. **Petersen ML, van der Laan MJ, Napravnik S, Eron JJ, Moore RD, Deeks SG.** 2008. Long-Term Consequences of the Delay between Virologic Failure of Highly Active Antiretroviral Therapy and Regimen Modification. *AIDS* 22(16): 2097-106.

547. **Peterson L, Taylor D, Roddy R, Belai G, Phillips P, Nanda K, Grant R, Clarke EE, Doh AS, Ridzon R, Jaffe HS, Cates W.** 2007. Tenofovir Disoproxil Fumarate for Prevention of Hiv Infection in Women: A Phase 2, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *PLoS Clin Trials* 2(5): e27.
548. **Pettit SM, SF., Swanstrom R.** 1993. The Specificity of the Hiv-1 Protease. *Perspect. Drug Discov. Des.* 1(69-83.).
549. **Pierson TC, Doms RW.** 2003. Hiv-1 Entry and Its Inhibition. *Curr Top Microbiol Immunol* 281 1-27.
550. **Pilger D, Hauser A, Kuecherer C, Mugenyi K, Kabasinguzi R, Somogyi S, Harms G, Kunz A.** 2011. Minor Drug-Resistant Hiv Type-1 Variants in Breast Milk and Plasma of Hiv Type-1-Infected Ugandan Women after Nevirapine Single-Dose Prophylaxis. *Antivir Ther* 16(1): 109-13.
551. **Pisani E, Lazzari S, Walker N, Schwartlander B.** 2003. Hiv Surveillance: A Global Perspective. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32 Suppl 1 S3-11.
552. **Plantier JC, Damond F, Lasky M, Sankale JL, Apetrei C, Peeters M, Buzelay L, M'Boup S, Kanki P, Delaporte E, Simon F, Barin F.** 1999. V3 Serotyping of Hiv-1 Infection: Correlation with Genotyping and Limitations. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20(5): 432-41.
553. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F.** 2009. A New Human Immunodeficiency Virus Derived from Gorillas. *Nat Med* 15(8): 871-2.
554. **Plate DK.** 2007. Evaluation and Implementation of Rapid Hiv Tests: The Experience in 11 African Countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(12): 1491-8.
555. **Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, Lee B, Coleman N, Doms RW.** 2001. Dc-Signr, a Dc-Sign Homologue Expressed in Endothelial Cells, Binds to Human and Simian Immunodeficiency Viruses and Activates Infection in Trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2670-5.
556. **Pollakis G, Abebe A, Kliphuis A, De Wit TF, Fisseha B, Tegbaru B, Tesfaye G, Negassa H, Mengistu Y, Fontanet AL, Cornelissen M, Goudsmit J.** 2003. Recombination of Hiv Type 1c ('C/C') in Ethiopia: Possible Link of Ethhiv-1c' to Subtype C Sequences from the High-Prevalence Epidemics in India and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(11): 999-1008.
557. **Pollard VW, Malim MH.** 1998. The Hiv-1 Rev Protein. *Annu Rev Microbiol* 52 491-532.
558. **Pomerantz RJ.** 2002. Eliminating Hiv-1 Reservoirs. *Curr Opin Investig Drugs* 3(8): 1133-7.
559. **Pond SJ, Ridgeway WK, Robertson R, Wang J, Millar DP.** 2009. Hiv-1 Rev Protein Assembles on Viral Rna One Molecule at a Time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5): 1404-8.
560. **Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ.** 1999. Lower Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Type 2 Viral Load Reflects the Difference in Pathogenicity of Hiv-1 and Hiv-2. *J Infect Dis* 180(4): 1116-21.
561. **Posada D, Crandall KA.** 2001. Evaluation of Methods for Detecting Recombination from DNA Sequences: Computer Simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13757-62.
562. **Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA.** 1988. Fidelity of Hiv-1 Reverse Transcriptase. *Science* 242(4882): 1168-71.
563. **Pyne MT, Hackett J, Jr., Holzmayer V, Hillyard DR.** 2013. Large-Scale Analysis of the Prevalence and Geographic Distribution of Hiv-1 Non-B Variants in the United States. *J Clin Microbiol* 51(8): 2662-9.
564. **Qi Y, Martin MP, Gao X, Jacobson L, Goedert JJ, Buchbinder S, Kirk GD, O'Brien SJ, Trowsdale J, Carrington M.** 2006. Kir/Hla Pleiotropism: Protection against Both Hiv and Opportunistic Infections. *PLoS Pathog* 2(8): e79.
565. **Quashie PK, Sloan RD, Wainberg MA.** 2012. Novel Therapeutic Strategies Targeting Hiv Integrase. *BMC Med* 10 34.
566. **Quercia R, Dam E, Perez-Bercoff D, Clavel F.** 2009. Selective-Advantage Profile of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Mutants Explains in Vivo Evolution of Raltegravir Resistance Genotypes. *J Virol* 83(19): 10245-9.
567. **Radzio J, Yap SH, Tachedjian G, Sluis-Cremer N.** 2010. N348i in Reverse Transcriptase Provides a Genetic Pathway for Hiv-1 to Select Thymidine Analogue Mutations and Mutations Antagonistic to Thymidine Analogue Mutations. *AIDS* 24(5): 659-67.

568. **Ragupathy V, Zhao J, Wood O, Tang S, Lee S, Nyambi P, Hewlett I.** 2011. Identification of New, Emerging Hiv-1 Unique Recombinant Forms and Drug Resistant Viruses Circulating in Cameroon. *Virol J* 8:185.
569. **Rainwater S, DeVange S, Sagar M, Ndinya-Achola J, Mandaliya K, Kreiss JK, Overbaugh J.** 2005. No Evidence for Rapid Subtype C Spread within an Epidemic in Which Multiple Subtypes and Intersubtype Recombinants Circulate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(12): 1060-5.
570. **Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC.** 2004. The Causes and Consequences of Hiv Evolution. *Nat Rev Genet* 5(1): 52-61.
571. **Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M.** 2008. Implications of Recombination for Hiv Diversity. *Virus Res* 134(1-2): 64-73.
572. **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.** 2002. Intersubtype Human Immunodeficiency Virus Type 1 Superinfection Following Seroconversion to Primary Infection in Two Injection Drug Users. *J Virol* 76(15): 7444-52.
573. **Ravanshad M, Mahboudi F, Sabahi F, Bayanolagh S.** 2006. Indeterminate Human Immunodeficiency Virus Western Blot Results in Iranian Patients with Discordant Screening Assay Results. *Saudi Med J* 27(8): 1130-3.
574. **Ravela J, Betts BJ, Brun-Vezinet F, Vandamme AM, Descamps D, van Laethem K, Smith K, Schapiro JM, Winslow DL, Reid C, Shafer RW.** 2003. Hiv-1 Protease and Reverse Transcriptase Mutation Patterns Responsible for Discordances between Genotypic Drug Resistance Interpretation Algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(1): 8-14.
575. **Rayfield MA, Sullivan P, Bandea CI, Britvan L, Otten RA, Pau CP, Pieniazek D, Subbarao S, Simon P, Schable CA, Wright AC, Ward J, Schochetman G.** 1996. Hiv-1 Group O Virus Identified for the First Time in the United States. *Emerg Infect Dis* 2(3): 209-12.
576. **Reid S, Fidler S, Cooke G.** 2013. Tracking the Progress of Hiv : The Impact of Point-of-Care Tests on Antiretroviral Therapy. *Clin Epidemiol.* 26(5): 387-96.
577. **Ren J, Stammers DK.** 2008. Structural Basis for Drug Resistance Mechanisms for Non-Nucleoside Inhibitors of Hiv Reverse Transcriptase. *Virus Res* 134(1-2): 157-70.
578. **Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M.** 2004. Preferential in-Utero Transmission of Hiv-1 Subtype C as Compared to Hiv-1 Subtype a or D. *AIDS* 18(12): 1629-36.
579. **Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri 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 JM-TI.** 2009. Vaccination with Alvac and Aidsvax to Prevent Hiv-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med.* 361(23): 2209-20. .
580. **Revell AD, Wang D, Harrigan R, Hamers RL, Wensing AM, Dewolf F, Nelson M, Geretti AM, Larder BA.** 2010. Modelling Response to Hiv Therapy without a Genotype: An Argument for Viral Load Monitoring in Resource-Limited Settings. *J Antimicrob Chemother* 65(4): 605-7.
581. **Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, Hurley L, Liu T, Taylor J, Nguyen DP, Slome S, Klein D, Horberg M, Flamm J, Follansbee S, Schapiro JM, Shafer RW.** 2005. Hiv-1 Protease and Reverse-Transcriptase Mutations: Correlations with Antiretroviral Therapy in Subtype B Isolates and Implications for Drug-Resistance Surveillance. *J Infect Dis* 192(3): 456-65.
582. **Rhee SY, Liu T, Ravela J, Gonzales MJ, Shafer RW.** 2004. Distribution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Reverse Transcriptase Mutation Patterns in 4,183 Persons Undergoing Genotypic Resistance Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 48(8): 3122-6.
583. **Rhee SY, Taylor J, Wadhera G, Ben-Hur A, Brutlag DL, Shafer RW.** 2006. Genotypic Predictors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17355-60.
584. **Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA.** 1988. The Accuracy of Reverse Transcriptase from Hiv-1. *Science* 242(4882): 1171-3.
585. **Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N.** 2012. Challenges and Opportunities for the Implementation of Virological Testing in Resource-Limited Settings. *J Int AIDS Soc* 15(2): 17324.

586. **Robertson DL, Hahn BH, Sharp PM.** 1995. Recombination in Aids Viruses. *J Mol Evol* 40(3): 249-59.
587. **Rodes B, Sheldon J, Toro C, Cuevas L, Perez-Pastrana E, Herrera I, Soriano V.** 2007. Quantitative Detection of Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 2 Subtype a Rna by the Nuclisens Easyq Assay (Version 1.1). *J Clin Microbiol* 45(1): 88-92.
588. **Rohan LC, Moncla BJ, Kunjara Na Ayudhya RP, Cost M, Huang Y, Gai F, Billitto N, Lynam JD, Pryke K, Graebing P, Hopkins N, Rooney JF, Friend D, Dezzutti CS.** 2010. In Vitro and Ex Vivo Testing of Tenofovir Shows It Is Effective as an Hiv-1 Microbicide. *PLoS One* 5(2): e9310.
589. **Romani B, Engelbrecht S.** 2009. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr: Functions and Molecular Interactions. *J Gen Virol* 90(Pt 8): 1795-805.
590. **Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P.** 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem* 242(1): 84-9.
591. **Ronaghi M, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P.** 1998. Pcr-Introduced Loop Structure as Primer in DNA Sequencing. *Biotechniques* 25(5): 876-8, 80-2, 84.
592. **Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P.** 1998. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* 281(5375): 363, 65.
593. **Roquebert B, Leleu J.** 2010. La Transcriptase Inverse Du Vih-1 : Rôle Du Domaine De Connexion Et De La Rnase H Dans La Résistance Aux Antirétroviraux.. *Virologie* 14( 2 ): 129-39.
594. **Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Apetrei C, Nerrienet E, Barre-Sinoussi F, Muller-Trutwin M, Simon F.** 2004. Phylogenetic Characteristics of Three New Hiv-1 N Strains and Implications for the Origin of Group N. *AIDS* 18(10): 1371-81.
595. **Rosenbluh J, Hayouka Z, Loya S, Levin A, Armon-Omer A, Britan E, Hizi A, Kotler M, Friedler A, Loyter A.** 2007. Interaction between Hiv-1 Rev and Integrase Proteins: A Basis for the Development of Anti-Hiv Peptides. *J Biol Chem* 282(21): 15743-53.
596. **Rouet F, Ekouevi DK, Inwoley A, Chaix ML, Burgard M, Bequet L, Viho I, Leroy V, Simon F, Dabis F, Rouzioux C.** 2004. Field Evaluation of a Rapid Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Serial Serologic Testing Algorithm for Diagnosis and Differentiation of Hiv Type 1 (Hiv-1), Hiv-2, and Dual Hiv-1-Hiv-2 Infections in West African Pregnant Women. *J Clin Microbiol* 42(9): 4147-53.
597. **Rouet F, Foulongne V, Viljoen J, Steegen K, Becquart P, Valea D, Danaviah S, Segondy M, Verhofstede C, Van de Perre P.** 2010. Comparison of the Generic Hiv Viral Load Assay with the Amplicor Hiv-1 Monitor V1.5 and Nuclisens Hiv-1 Easyq V1.2 Techniques for Plasma Hiv-1 Rna Quantitation of Non-B Subtypes: The Kesho Bora Preparatory Study. *J Virol Methods* 163(2): 253-7.
598. **Rulli SJ, Jr., Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, Rein A.** 2006. Mutant Murine Leukemia Virus Gag Proteins Lacking Proline at the N-Terminus of the Capsid Domain Block Infectivity in Virions Containing Wild-Type Gag. *Virology* 347(2): 364-71.
599. **Sackett K, Wexler-Cohen Y, Shai Y.** 2006. Characterization of the Hiv N-Terminal Fusion Peptide-Containing Region in Context of Key Gp41 Fusion Conformations. *J Biol Chem* 281(31): 21755-62.
600. **Sahni AK, Prasad VV, Seth P.** 2002. Genomic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in India. *Int J STD AIDS* 13(2): 115-8.
601. **Saitou N, Nei M.** 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-25.
602. **Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T.** 2007. Minimal Region Sufficient for Genome Dimerization in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion and Its Potential Roles in the Early Stages of Viral Replication. *J Virol* 81(15): 7985-92.
603. **Salazar-Gonzalez JF, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, Derdeyn CA, Farmer P, Hunter E, Allen S, Manigart O, Mulenga J, Anderson JA, Swanstrom R, Haynes BF, Athreya GS, Korber BT, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH.** 2008. Deciphering Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission and Early Envelope Diversification by Single-Genome Amplification and Sequencing. *J Virol* 82(8): 3952-70.
604. **Salmela L.** 2010. Correction of Sequencing Errors in a Mixed Set of Reads. *Bioinformatics* 26(10): 1284-90.

605. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. 1995. Identification of Breakpoints in Intergenotypic Recombinants of Hiv Type 1 by Bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(11): 1423-5.
606. Sanger F. 1981. Determination of Nucleotide Sequences in DNA. *Biosci Rep* 1(1): 3-18.
607. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12): 5463-67.
608. Santiago ML, Lukasik M, Kamenya S, Li Y, Bibollet-Ruche F, Bailes E, Muller MN, Emery M, Goldenberg DA, Lwanga JS, Ayouba A, Nerrienet E, McClure HM, Heaney JL, Watts DP, Pusey AE, Collins DA, Wrangham RW, Goodall J, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. 2003. Foci of Endemic Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Eastern Chimpanzees (*Pan Troglodytes Schweinfurthii*). *J Virol* 77(13): 7545-62.
609. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Fruteau C, Noe R, Peeters M, Brookfield JF, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 2005. Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabees (*Cercopithecus Atys Atys*) from the Tai Forest, Côte D'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2. *J Virol* 79(19): 12515-27.
610. Santoro MM, Alteri C, Ronga L, Flandre P, Fabeni L, Mercurio F, D'Arrigo R, Gori C, Palamara G, Bertoli A, Forbici F, Salpini R, Boumis E, Tozzi V, Visco-Comandini U, Zaccarelli M, Van Houtte M, Pattery T, Narciso P, Antinori A, Ceccherini-Silberstein F, Perno CF. 2012. Comparative Analysis of Drug Resistance among B and the Most Prevalent Non-B Hiv Type 1 Subtypes (C, F, and Crf02\_Ag) in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(10): 1285-93.
611. Santoro MM, Perno CF. 2013. Hiv-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol* 2013: 481314.
612. Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, Lengruber RB, Soares EA, Sprinz E, Soares MA. 2007. Epidemiologic and Evolutionary Trends of Hiv-1 Crf31\_Bc-Related Strains in Southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(3): 328-33.
613. Santos AF, Soares MA. 2010. Hiv Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses* 2(2): 503-31.
614. Santos AF, Soares MA. 2011. The Impact of the Nelfinavir Resistance-Conferring Mutation D30n on the Susceptibility of Hiv-1 Subtype B to Other Protease Inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(2): 177-81.
615. Saracino A, Monno L, Scudeller L, Cibelli DC, Tartaglia A, Punzi G, Torti C, Lo Caputo S, Mazzotta F, Scotto G, Carosi G, Angarano G. 2006. Impact of Unreported Hiv-1 Reverse Transcriptase Mutations on Phenotypic Resistance to Nucleoside and Non-Nucleoside Inhibitors. *J Med Virol* 78(1): 9-17.
616. Sarafianos SG, Das K, Hughes SH, Arnold E. 2004. Taking Aim at a Moving Target: Designing Drugs to Inhibit Drug-Resistant Hiv-1 Reverse Transcriptases. *Curr Opin Struct Biol* 14(6): 716-30.
617. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E. 2009. Structure and Function of Hiv-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *J Mol Biol* 385(3): 693-713.
618. Sauter D, Kirchhoff F. 2011. Tetherin Antagonism by Primate Lentiviral Nef Proteins. *Curr HIV Res* 9(7): 514-23.
619. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziloannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-Driven Adaptation of Vpu and Nef Function and the Evolution of Pandemic and Nonpandemic Hiv-1 Strains. *Cell Host Microbe* 6(5): 409-21.
620. Sax PE. 2008. Fda Approval: Etravirine. *AIDS Clin Care* 20(3): 17-8.
621. Sax PE, DeJesus E, Mills A, Zolopa A, Cohen C, Wohl D, Gallant JE, Liu HC, Zhong L, Yale K, White K, Kearney BP, Szwarcberg J, Quirk E, Cheng AK. 2012. Co-Formulated Elvitegravir, Cobicistat, Emtricitabine, and Tenofovir Versus Co-Formulated Efavirenz, Emtricitabine, and Tenofovir for Initial Treatment of Hiv-1 Infection: A Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial, Analysis of Results after 48 Weeks. *Lancet* 379(9835): 2439-48.

622. **Scarlata S, Carter C.** 2003. Role of Hiv-1 Gag Domains in Viral Assembly. *Biochim Biophys Acta* 1614(1): 62-72.
623. **Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL.** 2008. Hiv-1 Nef Targets Mhc-I and Cd4 for Degradation Via a Final Common Beta-Cop-Dependent Pathway in T Cells. *PLoS Pathog* 4(8): e1000131.
624. **Schafer A, Bogerd HP, Cullen BR.** 2004. Specific Packaging of Apobec3g into Hiv-1 Virions Is Mediated by the Nucleocapsid Domain of the Gag Polyprotein Precursor. *Virology* 328(2): 163-8.
625. **Schafer JJ, Short WR.** 2012. Rilpivirine, a Novel Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor for the Management of Hiv-1 Infection: A Systematic Review. *Antivir Ther* 17(8): 1495-502.
626. **Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC.** 2009. Broad Diversity of Neutralizing Antibodies Isolated from Memory B Cells in Hiv-Infected Individuals. *Nature* 458(7238): 636-40.
627. **Schiller DS, Youssef-Bessler M.** 2009. Etravirine: A Second-Generation Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (Nnrti) Active against Nnrti-Resistant Strains of Hiv. *Clin Ther* 31(4): 692-704.
628. **Schrijvers R, De Rijck J, Demeulemeester J, Adachi N, Vets S, Ronen K, Christ F, Bushman FD, Debysen Z, Gijsbers R.** 2012. Ledgf/P75-Independent Hiv-1 Replication Demonstrates a Role for Hrp-2 and Remains Sensitive to Inhibition by Ledgins. *PLoS Pathog* 8(3): e1002558.
629. **Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orlowski M, Strelbel K, Yewdell JW.** 1998. Cd4 Glycoprotein Degradation Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Requires the Function of Proteasomes and the Ubiquitin-Conjugating Pathway. *J Virol* 72(3): 2280-8.
630. **Schupbach J, Bisset LR, Gebhardt MD, Regenass S, Burgisser P, Gorgievski M, Klimkait T, Andreutti C, Martinetti G, Niederhauser C, Yerly S, Pfister S, Schultze D, Brandenberger M, Schoni-Affolter F, Scherrer AU, Gunthard HF.** 2012. Diagnostic Performance of Line-Immunoassay Based Algorithms for Incident Hiv-1 Infection. *BMC Infect Dis* 12 88.
631. **Scott LE, Noble LD, Moloi J, Erasmus L, Venter WD, Stevens W.** 2009. Evaluation of the Abbott M2000 Realtime Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Assay for Hiv Load Monitoring in South Africa Compared to the Roche Cobas Ampliprep-Cobas Amplicor, Roche Cobas Ampliprep-Cobas Taqman Hiv-1, and Biomerieux Nuclisens Easyq Hiv-1 Assays. *J Clin Microbiol* 47(7): 2209-17.
632. **Servais J, Lambert C, Fontaine E, Plesseria JM, Robert I, Arendt V, Staub T, Schneider F, Hemmer R, Burtonboy G, Schmit JC.** 2001. Comparison of DNA Sequencing and a Line Probe Assay for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Patients Failing Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin Microbiol* 39(2): 454-9.
633. **Servais J, Lambert C, Plesseria JM, Fontaine E, Robert I, Arendt V, Staub T, Hemmer R, Schneider F, Schmit JC.** 2002. Longitudinal Use of a Line Probe Assay for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Predicts Phenotypic Resistance and Clinical Progression in Patients Failing Highly Active Antiretroviral Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6): 1928-33.
634. **Serwanga J, Mugaba S, Pimego E, Nanteza B, Lyagoba F, Nakubulwa S, Heath L, Nsubuga RN, Ndembu N, Gotch F, Kaleebu P.** 2012. Profile of T Cell Recognition of Hiv Type 1 Consensus Group M Gag and Nef Peptides in a Clade A1- and D-Infected Ugandan Population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(4): 384-92.
635. **Sevilya Z, Loya S, Adir N, Hizi A.** 2003. The Ribonuclease H Activity of the Reverse Transcriptases of Human Immunodeficiency Viruses Type 1 and Type 2 Is Modulated by Residue 294 of the Small Subunit. *Nucleic Acids Res* 31(5): 1481-7.
636. **Shafer RW.** 2002. Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 15(2): 247-77.
637. **Shafer RW, Hsu P, Patick AK, Craig C, Brendel V.** 1999. Identification of Biased Amino Acid Substitution Patterns in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Protease Inhibitors. *J Virol* 73(7): 6197-202.

638. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, Kuritzkes DR, Bennett D. 2007. Hiv-1 Protease and Reverse Transcriptase Mutations for Drug Resistance Surveillance. *AIDS* 21(2): 215-23.
639. Shafer RW, Schapiro JM. 2008. Hiv-1 Drug Resistance Mutations: An Updated Framework for the Second Decade of Haart. *AIDS Rev* 10(2): 67-84.
640. Sharma A, Yilmaz A, Marsh K, Cochrane A, Boris-Lawrie K. 2012. Thriving under Stress: Selective Translation of Hiv-1 Structural Protein Mrna During Vpr-Mediated Impairment of Eif4e Translation Activity. *PLoS Pathog* 8(3): e1002612.
641. Sharma PL, Nettles JH, Feldman A, Rapp K, Schinazi RF. 2009. Comparative Analysis of in Vitro Processivity of Hiv-1 Reverse Transcriptases Containing Mutations 65r, 74v, 184v and 65r+74v. *Antiviral Res* 83(3): 317-23.
642. Sharp PM, Hahn BH. 2010. The Evolution of Hiv-1 and the Origin of Aids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1552): 2487-94.
643. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a Human Gene That Inhibits Hiv-1 Infection and Is Suppressed by the Viral Vif Protein. *Nature* 418(6898): 646-50.
644. Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol Ratio Is Important for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rna Dimerization and Viral Infectivity. *J Virol* 75(4): 1834-41.
645. Shih CK, Rose JM, Hansen GL, Wu JC, Bacolla A, Griffin JA. 1991. Chimeric Human Immunodeficiency Virus Type 1/Type 2 Reverse Transcriptases Display Reversed Sensitivity to Nonnucleoside Analog Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21): 9878-82.
646. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. 2008. Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (Jtk-303/Gs-9137). *J Virol* 82(2): 764-74.
647. Shulman NS, Bosch RJ, Mellors JW, Albrecht MA, Katzenstein DA. 2004. Genetic Correlates of Efavirenz Hypersusceptibility. *AIDS* 18(13): 1781-5.
648. Sickinger E, Stieler M, Kaufman B, Kapprell HP, West D, Sandridge A, Devare S, Schochetman G, Hunt JC, Daghfal D. 2004. Multicenter Evaluation of a New, Automated Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of Human Immunodeficiency Virus-Specific Antibodies and Antigen. *J Clin Microbiol* 42(1): 21-9.
649. Sigaloff KC, Hamers RL, Wallis CL, Kityo C, Siwale M, Ive P, Botes ME, Mandaliya K, Wellington M, Osibogun A, Stevens WS, van Vugt M, de Wit TF. 2011. Unnecessary Antiretroviral Treatment Switches and Accumulation of Hiv Resistance Mutations; Two Arguments for Viral Load Monitoring in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58(1): 23-31.
650. Silveira J, Santos AF, Martinez AM, Goes LR, Mendoza-Sassi R, Muniz CP, Tupinambas U, Soares MA, Greco DB. 2012. Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C in Southern Brazil. *J Clin Virol* 54(1): 36-41.
651. Silvestri G, Fedanov A, Germon S, Kozyr N, Kaiser WJ, Garber DA, McClure H, Feinberg MB, Staprans SI. 2005. Divergent Host Responses During Primary Simian Immunodeficiency Virus Sivsm Infection of Natural Sooty Mangabey and Nonnatural Rhesus Macaque Hosts. *J Virol* 79(7): 4043-54.
652. Simon F, Mauclere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F. 1998. Identification of a New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Distinct from Group M and Group O. *Nat Med* 4(9): 1032-7.
653. Simon-Loriere E, Galetto R, Hamoudi M, Archer J, Lefevre P, Martin DP, Robertson DL, Negroni M. 2009. Molecular Mechanisms of Recombination Restriction in the Envelope Gene of the Human Immunodeficiency Virus. *PLoS Pathog* 5(5): e1000418.
654. Sitnikova T. 1996. Bootstrap Method of Interior-Branch Test for Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 13(4): 605-11.

655. Sizmann D, Glaubitz J, Simon CO, Goedel S, Buergisser P, Drogan D, Hesse M, Kroh M, Simmler P, Dewald M, Gilsdorf M, Fuerst M, Ineichen R, Kirn A, Pasche P, Wang Z, Weisshaar S, Young K, Haberhausen G, Babiel R. 2010. Improved Hiv-1 RNA Quantitation by Cobas Ampliprep/Cobas Taqman Hiv-1 Test, V2.0 Using a Novel Dual-Target Approach. *J Clin Virol* 49(1): 41-6.
656. Sluis-Cremer N, Sheen CW, Zelina S, Torres PS, Parikh UM, Mellors JW. 2007. Molecular Mechanism by Which the K70e Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confers Resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 48-53.
657. Smith DM, Richman DD, Little SJ. 2005. Hiv Superinfection. *J Infect Dis* 192(3): 438-44.
658. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. 2012. The Origin of Genetic Diversity in Hiv-1. *Virus Res* 169(2): 415-29.
659. Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan RP, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM. 2006. Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic Resistance to Protease and Reverse Transcriptase Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrob Agents Chemother* 50(2): 694-701.
660. Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA. 2005. Hiv-1 Subtype C Dissemination in Southern Brazil. *AIDS* 19 Suppl 4 S81-6.
661. Sohn AH, Thanh TC, Thinh le Q, Khanh TH, Thu HK, Giang le T, Lien TX. 2009. Failure of Human Immunodeficiency Virus Enzyme Immunoassay to Rule out Infection among Polymerase Chain Reaction-Negative Vietnamese Infants at 12 Months of Age. *Pediatr Infect Dis J* 28(4): 273-6.
662. Sokal DC, Karim QA, Sibeko S, Yende-Zuma N, Mansoor LE, Baxter C, Grobler A, Frolich J, Kharsany AB, Miya N, Mlisana K, Marshalk S, Karim SS. 2013. Safety of Tenofovir Gel, a Vaginal Microbicide, in South African Women: Results of the Caprisa 004 Trial. *Antivir Ther* 18(3): 301-10.
663. Somi GR, Kibuka T, Diallo K, Tuhuma T, Bennett DE, Yang C, Kagoma C, Lyamuya EF, Swai RO, Kassim S. 2008. Surveillance of Transmitted Hiv Drug Resistance among Women Attending Antenatal Clinics in Dar Es Salaam, Tanzania. *Antivir Ther* 13 Suppl 2 77-82.
664. Song EY, Hur M, Roh EY, Park MH, Moon HW, Yun YM. 2012. Performances of Four Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus-1 Screening Assays. *J Med Virol* 84(12): 1884-8.
665. Song R, Kafaie J, Yang L, Laughrea M. 2007. Hiv-1 Viral RNA Is Selected in the Form of Monomers That Dimerize in a Three-Step Protease-Dependent Process; the Dis of Stem-Loop 1 Initiates Viral RNA Dimerization. *J Mol Biol* 371(4): 1084-98.
666. Soudis J, Nei M. 1988. Relative Efficiencies of the Maximum Parsimony and Distance-Matrix Methods in Obtaining the Correct Phylogenetic Tree. *Mol Biol Evol* 5(3): 298-311.
667. Ssemwanga D, Kapaata A, Lyagoba F, Magambo B, Nanyonjo M, Mayanja BN, Parry CM, Kaleebu P. 2012. Low Drug Resistance Levels among Drug-Naive Individuals with Recent Hiv Type 1 Infection in a Rural Clinical Cohort in Southwestern Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(12): 1784-7.
668. St Clair MH, Richards CA, Spector T, Weinhold KJ, Miller WH, Langlois AJ, Furman PA. 1987. 3'-Azido-3'-Deoxythymidine Triphosphate as an Inhibitor and Substrate of Purified Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 31(12): 1972-7.
669. St Gelais C, Coleman CM, Wang JH, Wu L. 2012. Hiv-1 Nef Enhances Dendritic Cell-Mediated Viral Transmission to Cd4+ T Cells and Promotes T-Cell Activation. *PLoS One* 7(3): e34521.
670. Stadeli KM, Richman DD. 2013. Rates of Emergence of Hiv Drug Resistance in Resource-Limited Settings: A Systematic Review. *Antivir Ther* 18(1): 115-23.
671. Stanojevic M, Alexiev I, Beshkov D, Gokengin D, Mezei M, Minarovits J, Otelea D, Paraschiv S, Poljak M, Zidovec-Lepej S, Paraskevis D. 2012. Hiv1 Molecular Epidemiology in the Balkans: A Melting Pot for High Genetic Diversity. *AIDS Rev* 14(1): 28-36.

672. **Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al.** 1986. Identification and Characterization of Conserved and Variable Regions in the Envelope Gene of Htlv-Iii/Lav, the Retrovirus of Aids. *Cell* 45(5): 637-48.
673. **Stellbrink HJ.** 2009. Raltegravir in the Management of Hiv-Infected Patients. *Drug Des Dev Ther* 2 281-88.
674. **Stephan C, Dauer B, Khaykin P, Stuermer M, Gute P, Klauke S, Staszewski S.** 2009. Quadruple Nucleos(T)ide Reverse Transcriptase Inhibitors-Only Regimen of Tenofovir Plus Zidovudine/Lamivudine/Abacavir in Heavily Pre-Treated Hiv-1 Infected Patients: Salvage Therapy or Backbone Only? *Curr HIV Res* 7(3): 320-6.
675. **Sturmer M, Dauer B, Moesch M, Haberl A, Mueller A, Locher L, Knecht G, Hanke N, Doerr HW, Staszewski S.** 2007. Evolution of Resistance Mutations During Low-Level Viral Replication in Hiv-1-Infected Patients Treated with Zidovudine/Lamivudine/Abacavir as a First-Line Regimen. *Antivir Ther* 12(1): 25-30.
676. **Sturmer M, Stephan C, Gute P, Knecht G, Bickel M, Brodt HR, Doerr HW, Gurtler L, Lecocq P, van Houtte M.** 2011. Comparison of Drug Resistance Scores for Tipranavir in Protease Inhibitor-Naive Patients Infected with Hiv-1 B and Non-B Subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11): 5362-6.
677. **Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, Rimland D, Schinazi RF, Rossau R.** 1997. Line Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Selected Mutations in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 41(2): 284-91.
678. **Su C, Melby T, DeMasi R, Ravindran P, Heilek-Snyder G.** 2006. Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins on Treatment with the Fusion Inhibitor Enfuvirtide and Their Influence on Changes in Drug Susceptibility in Vitro. *J Clin Virol* 36(4): 249-57.
679. **Sucupira MC, Sanabani S, Cortes RM, Giret MT, Tomiyama H, Sauer MM, Sabino EC, Janini LM, Kallas EG, Diaz RS.** 2012. Faster Hiv-1 Disease Progression among Brazilian Individuals Recently Infected with Cxcr4-Utilizing Strains. *PLoS One* 7(1): e30292.
680. **Sungkanuparph S, Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Piyavong B, Chantratita W.** 2008. Evaluating the Role of Etravirine in the Second-Line Antiretroviral Therapy after Failing an Initial Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based Regimen in a Resource-Limited Setting. *Curr HIV Res* 6(5): 474-6.
681. **Svicher V, Ceccherini-Silberstein F, Erba F, Santoro M, Gori C, Bellocchi MC, Giannella S, Trotta MP, Monforte A, Antinori A, Perno CF.** 2005. Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Mutations Potentially Involved in Resistance to Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 49(5): 2015-25.
682. **Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, Golden A, Hodinka RL, Soriano V, Devare SG, Hackett J, Jr.** 2005. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Genetic Diversity on Performance of Four Commercial Viral Load Assays: Lcx Hiv Rna Quantitative, Amplicor Hiv-1 Monitor V1.5, Versant Hiv-1 Rna 3.0, and Nuclisens Hiv-1 Qt. *J Clin Microbiol* 43(8): 3860-8.
683. **Swanson P, Huang S, Abravaya K, de Mendoza C, Soriano V, Devare SG, Hackett J, Jr.** 2007. Evaluation of Performance across the Dynamic Range of the Abbott Realtime Hiv-1 Assay as Compared to Versant Hiv-1 Rna 3.0 and Amplicor Hiv-1 Monitor V1.5 Using Serial Dilutions of 39 Group M and O Viruses. *J Virol Methods* 141(1): 49-57.
684. **Swanstrom R, Wills JW.** 1997. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins, Coffin JM, et coll., *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY):
685. **Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A, Bailes E, Van Heuverswyn F, Decker JM, Li Y, Rudicell RS, Learn GH, Neel C, Ngole EM, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Hahn B.** .2009. Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. *J Virol*. 83(4): 1635-48.
686. **Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A, Bailes E, Van Heuverswyn F, Decker JM, Li Y, Rudicell RS, Learn GH, Neel C, Ngole EM, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Hahn BH.** 2009. Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. *J Virol* 83(4): 1635-48.

687. **Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptu L, Hayami M.** 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Intergroup (M/O) Recombination in Cameroon. *J Virol* 73(8): 6810-20.
688. **Talbot A, Grant P, Taylor J, Baril JG, Liu TF, Charest H, Brenner B, Roger M, Shafer R, Cantin R, Zolopa A.** 2010. Predicting Tipranavir and Darunavir Resistance Using Genotypic, Phenotypic, and Virtual Phenotypic Resistance Patterns: An Independent Cohort Analysis of Clinical Isolates Highly Resistant to All Other Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 54(6): 2473-9.
689. **Tang MW, Rhee SY, Bertagnolio S, Ford N, Holmes S, Sigaloff KC, Hamers RL, de Wit TF, Fleury HJ, Kanki PJ, Ruxrungtham K, Hawkins CA, Wallis CL, Stevens W, van Zyl GU, Manosuthi W, Hosseiniipour MC, Ngo-Giang-Huong N, Belec L, Peeters M, Aghokeng A, Bunupuradah T, Burda S, Cane P, Cappelli G, Charpentier C, Dagnra AY, Deshpande AK, El-Katib Z, Eshleman SH, Fokam J, Gody JC, Katzenstein D, Koyalta DD, Kumwenda JJ, Lallement M, Lynen L, Marconi VC, Margot NA, Moussa S, Ndung'u T, Nyambi PN, Orrell C, Schapiro JM, Schuurman R, Sirivichayakul S, Smith D, Zolfo M, Jordan MR, Shafer RW.** 2013. Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations Associated with First-Line Stavudine-Containing Antiretroviral Therapy: Programmatic Implications for Countries Phasing out Stavudine. *J Infect Dis* 207 Suppl 2 S70-7.
690. **Tang MW, Shafer RW.** 2012. Hiv-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs* 72(9): e1-25.
691. **Tang S, Murakami T, Cheng N, Steven AC, Freed EO, Levin JG.** 2003. Human Immunodeficiency Virus Type 1 N-Terminal Capsid Mutants Containing Cores with Abnormally High Levels of Capsid Protein and Virtually No Reverse Transcriptase. *J Virol* 77(23): 12592-602.
692. **Tartaglia A, Saracino A, Monno L, Tinelli C, Angarano G.** 2009. Both a Protective and a Deleterious Role for the L76v Mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 53(4): 1724-5.
693. **Tateno Y, Takezaki N, Nei M.** 1994. Relative Efficiencies of the Maximum-Likelihood, Neighbor-Joining, and Maximum-Parsimony Methods When Substitution Rate Varies with Site. *Mol Biol Evol* 11(2): 261-77.
694. **Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM.** 2008. The Challenge of Hiv-1 Subtype Diversity. *N Engl J Med* 358(15): 1590-602.
695. **Tee KK, Li XJ, Nohtomi K, Ng KP, 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 Defic Syndr* 43(5): 523-9.
696. **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.** 2013. Hiv-1 Genetic Diversity and Drug Resistance among Senegalese Patients in the Public Health System. *J Clin Microbiol* 51(2): 578-84.
697. **Thomas JA, Gorelick RJ.** 2008. Nucleocapsid Protein Function in Early Infection Processes. *Virus Res* 134(1-2): 39-63.
698. **Thomson MM, Vinogradova A, Delgado E, Rakhmanova A, Yakovlev A, Cuevas MT, Munoz M, Pinilla M, Vega Y, Perez-Alvarez L, Osmanov S, Najera R.** 2009. Molecular Epidemiology of Hiv-1 in St Petersburg, Russia: Predominance of Subtype a, Former Soviet Union Variant, and Identification of Intrasubtype Subclusters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51(3): 332-9.
699. **Tolstrup M, Selzer-Plon J, Laursen AL, Bertelsen L, Gerstoft J, Duch M, Pedersen FS, Ostergaard L.** 2007. Full Fusion Competence Rescue of the Enfuvirtide Resistant Hiv-1 Gp41 Genotype (43d) by a Prevalent Polymorphism (137k). *AIDS* 21(4): 519-21.
700. **Tongo M, Martin DP, Zembe L, Mpoudi-Ngole E, Williamson C, Burgers WA.** 2013. Characterization of Hiv-1 Gag and Nef in Cameroon: Further Evidence of Extreme Diversity at the Origin of the Hiv-1 Group M Epidemic. *Virol J* 10 29.
701. **Toni T, Adje-Toure C, Vidal N, Minga A, Huet C, Borger MY, Recordon-Pinson P, Masquelier B, Nolan M, Nkengasong J, Fleury HJ, Delaporte E, Peeters M.** 2005. Presence of Crf09\_Cpx and Complex Crf02\_Ag/Crf09\_Cpx Recombinant Hiv Type 1 Strains in Cote D'Ivoire, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(7): 667-72.

702. **Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, 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(6): 603-9.
703. **Tozzi V, Zaccarelli M, Bonfigli S, Lorenzini P, Liuzzi G, Trotta MP, Forbici F, Gori C, Bertoli A, Bellagamba R, Narciso P, Perno CF, Antinori A.** 2006. Drug-Class-Wide Resistance to Antiretrovirals in Hiv-Infected Patients Failing Therapy: Prevalence, Risk Factors and Virological Outcome. *Antivir Ther* 11(5): 553-60.
704. **Tran BR, Thomas AG, Ditsela M, Vaida F, Phetogo R, Kelapile D, Chambers C, Haubrich R, Shaffer R.** 2013. Condom Use Behaviours and Correlates of Use in the Botswana Defence Force. *Int J STD AIDS* 24(11): 883-92.
705. **Tran BR, Thomas AG, Vaida F, Ditsela M, Phetogo R, Kelapile D, Chambers C, Haubrich R, Shaffer R.** 2013. Comparisons of Reported Sexual Behaviors from a Retrospective Survey Versus a Prospective Diary in the Botswana Defence Force. *AIDS Educ Prev* 25(6): 495-507.
706. **Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, Apetrei C, Ekwalanga M, Delaporte E, Peeters M.** 1999. High Diversity of Hiv-1 Subtype F Strains in Central Africa. *Virology* 259(1): 99-109.
707. **Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M.** 2000. Near-Full-Length Genome Sequencing of Divergent African Hiv Type 1 Subtype F Viruses Leads to the Identification of a New Hiv Type 1 Subtype Designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16(2): 139-51.
708. **Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F.** 1992. Evolution of the Primate Lentiviruses: Evidence from Vpx and Vpr. *EMBO J* 11(9): 3405-12.
709. **Trivedi V, Von Lindern J, Montes-Walters M, Rojo DR, Shell EJ, Parkin N, O'Brien WA, Ferguson MR.** 2008. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Inhibitor Drug Resistance Mutation Interactions on Phenotypic Susceptibility. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(10): 1291-300.
710. **Troppan KT, Stelzl E, Violan D, Winkler M, Kessler HH.** 2009. Evaluation of the New Versant Hiv-1 Rna 1.0 Assay (Kpcr) for Quantitative Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rna. *J Clin Virol* 46(1): 69-74.
711. **Tsibris AM, Hirsch MS.** 2010. Antiretroviral Therapy in the Clinic. *J Virol* 84(11): 5458-64.
712. **Tsongalis GJ, Gleeson T, Rodina M, Anamani D, Ross J, Joanisse I, Tanimoto L, Ziermann R.** 2005. Comparative Performance Evaluation of the Hiv-1 Lipa Protease and Reverse Transcriptase Resistance Assay on Clinical Isolates. *J Clin Virol* 34(4): 268-71.
713. **Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M, Masuda T.** 2000. Identification of Critical Amino Acid Residues in Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Required for Efficient Proviral DNA Formation at Steps Prior to Integration in Dividing and Nondividing Cells. *J Virol* 74(10): 4795-806.
714. **Turner BG, Summers MF.** 1999. Structural Biology of Hiv. *J Mol Biol* 285(1): 1-32.
715. **Twigg Arrildt K.** 2012. The Hiv-1 Env Protein : A Coat of Many Colors. *Curr HIV/AIDS Rep* 9: 52-63.
716. **Uneke CJ, Alo MN, Ogbu O, Ngwu BA.** 2007. Western Blot-Indeterminate Results in Nigerian Patients Hiv Serodiagnosis: The Clinical and Public Health Implication. *AIDS Patient Care STDS* 21(3): 169-76.
717. **Usach I, Melis V, Peris JE.** 2013. Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors: A Review on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Tolerability. *J Int AIDS Soc* 16(1): 1-14.
718. **Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembı N, Mbanya D, Kaptue L, Gurtler LG, McArthur CP, Devare SG, Brennan CA.** 2010. Four New Hiv-1 Group N Isolates from Cameroon: Prevalence Continues to Be Low. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26(1): 109-15.
719. **Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptue L, Ndembı N, Gurtler L, Devare S, Brennan CA.** 2011. Confirmation of Putative Hiv-1 Group P in Cameroon. *J Virol* 85(3): 1403-7.
720. **Van Gulck E, Bracke L, Heyndrickx L, Coppens S, Atkinson D, Merlin C, Pasternak A, Florence E, Vanham G.** 2012. Immune and Viral Correlates of "Secondary Viral Control" after Treatment Interruption in Chronically Hiv-1 Infected Patients. *PLoS One* 7(5): e37792.

721. **Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M.** 2006. Human Immunodeficiency Viruses: Siv Infection in Wild Gorillas. *Nature* 444(7116): 164.
722. **Van Heuverswyn F, Peeters M.** 2007. The Origins of Hiv and Implications for the Global Epidemic. *Curr Infect Dis Rep* 9(4): 338-46.
723. **van Maarseveen NM, Andersson D, Lepsik M, Fun A, Schipper PJ, de Jong D, Boucher CA, Nijhuis M.** 2012. Modulation of Hiv-1 Gag Nc/P1 Cleavage Efficiency Affects Protease Inhibitor Resistance and Viral Replicative Capacity. *Retrovirology* 9 29.
724. **van Maarseveen NM, de Jong D, Boucher CA, Nijhuis M.** 2006. An Increase in Viral Replicative Capacity Drives the Evolution of Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Absence of Drugs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42(2): 162-8.
725. **Van Rompay KK, Johnson JA, Blackwood EJ, Singh RP, Lipscomb J, Matthews TB, Marthas ML, Pedersen NC, Bischofberger N, Heneine W, North TW.** 2007. Sequential Emergence and Clinical Implications of Viral Mutants with K70e and K65r Mutation in Reverse Transcriptase During Prolonged Tenofovir Monotherapy in Rhesus Macaques with Chronic Rt-Shiv Infection. *Retrovirology* 4 25.
726. **Van Vaerenbergh K, Van Laethem K, Albert J, Boucher CA, Clotet B, Floridia M, Gerstoft J, Hejdeman B, Nielsen C, Pannecouque C, Perrin L, Pirillo MF, Ruiz L, Schmit JC, Schneider F, Schoolmeester A, Schuurman R, Stellbrink HJ, Stuyver L, Van Lunzen J, Van Remoortel B, Van Wijngaerden E, Vella S, Witvrouw M, Yerly S, De Clercq E, Destmyer J, Vandamme AM.** 2000. Prevalence and Characteristics of Multinucleoside-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 among European Patients Receiving Combinations of Nucleoside Analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 44(8): 2109-17.
727. **Vandeckerckhove L.** 2010. Gsk-1349572, a Novel Integrase Inhibitor for the Treatment of Hiv Infection. *Curr Opin Investig Drugs*. 11 203-12.
728. **Vanden Haesevelde MM, Peeters M, Jannes G, Janssens W, van der Groen G, Sharp PM, Saman E.** 1996. Sequence Analysis of a Highly Divergent Hiv-1-Related Lentivirus Isolated from a Wild Captured Chimpanzee. *Virology* 221(2): 346-50.
729. **Vardabasso C, Manganaro L, Lusic M, Marcello A, Giacca M.** 2008. The Histone Chaperone Protein Nucleosome Assembly Protein-1 (Hnap-1) Binds Hiv-1 Tat and Promotes Viral Transcription. *Retrovirology* 5 8.
730. **Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S.** 1991. Selection, Recombination, and G----a Hypermutation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes. *J Virol* 65(4): 1779-88.
731. **Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, Fawzi W, Hunter D.** 2006. Different Rates of Disease Progression of Hiv Type 1 Infection in Tanzania Based on Infecting Subtype. *Clin Infect Dis* 42(6): 843-52.
732. **Velazquez-Campoy A, Vega S, Freire E.** 2002. Amplification of the Effects of Drug Resistance Mutations by Background Polymorphisms in Hiv-1 Protease from African Subtypes. *Biochemistry* 41(27): 8613-9.
733. **Vella S, Schwartlander B, Sow SP, Eholie SP, Murphy RL.** 2012. The History of Antiretroviral Therapy and of Its Implementation in Resource-Limited Areas of the World. *AIDS* 26(10): 1231-41.
734. **Veras NM, Veras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brigido MM, Martins CR.** 2007. Hiv Type 1 Genetic Variability in Central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(12): 1481-90.
735. **Vergani BR, S. .** 2011. Tipranavir in the Protease Inhibitors Arena. *Drugs in R&D* 11(4): 291-93.
736. **Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, Mboup S, Mulangang-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-naive patients. *J Clin Microbiol*. 38(11):3919-3925.
737. **Verheyen J, Litau E, Sing T, Daumer M, Balduin M, Oette M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Schuldenzucker U, Hoffmann D, Pfister H, Kaiser R.** 2006. Compensatory Mutations at the Hiv Cleavage Sites P7/P1 and P1/P6-Gag in Therapy-Naive and Therapy-Experienced Patients. *Antivir Ther* 11(7): 879-87.

738. **Verheyen J, Verhofstede C, Knops E, Vandekerckhove L, Fun A, Brunen D, Dauwe K, Wensing AM, Pfister H, Kaiser R, Nijhuis M.** 2010. High Prevalence of Bevirimat Resistance Mutations in Protease Inhibitor-Resistant Hiv Isolates. *AIDS* 24(5): 669-73.
739. **Vidal N, Bazepeo SE, Mulanga C, Delaporte E, Peeters M.** 2009. Genetic Characterization of Eight Full-Length Hiv Type 1 Genomes from the Democratic Republic of Congo (Drc) Reveal a New Subsubtype, A5, in the a Radiation That Predominates in the Recombinant Structure of Crf26\_A5u. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(8): 823-32.
740. **Vidal N, Diop H, Montavon C, Butel C, Bosch S, Ngole EM, Toure-Kane C, Mboup S, Delaporte E, Peeters M.** 2013. A Novel Multiregion Hybridization Assay Reveals High Frequency of Dual Inter-Subtype Infections among Hiv-Positive Individuals in Cameroon, West Central Africa. *Infect Genet Evol* 14: 73-82.
741. **Vidal N, Koyalta D, Richard V, Lechiche C, Ndinaromtan T, Djimasngar A, Delaporte E, Peeters M.** 2003. High Genetic Diversity of Hiv-1 Strains in Chad, West Central Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33(2): 239-46.
742. **Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M.** 2006. Identification and Molecular Characterization of Subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(2): 182-7.
743. **Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Mwamba JK, Tshimpaka JW, Kashi M, Mama N, Laurent C, Lepira F, Delaporte E, Peeters M.** 2005. Distribution of Hiv-1 Variants in the Democratic Republic of Congo Suggests Increase of Subtype C in Kinshasa between 1997 and 2002. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40(4): 456-62.
744. **Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E.** 2000. Unprecedented Degree of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Group M Genetic Diversity in the Democratic Republic of Congo Suggests That the Hiv-1 Pandemic Originated in Central Africa. *J Virol* 74(22): 10498-507.
745. **Vingerhoets J, Azijn H, Fransen E, De Baere I, Smeulders L, Jochmans D, Andries K, Pauwels R, de Bethune MP.** 2005. Tmc125 Displays a High Genetic Barrier to the Development of Resistance: Evidence from in Vitro Selection Experiments. *J Virol* 79(20): 12773-82.
746. **Vrolijk MM, Ooms M, Harwig A, Das AT, Berkhout B.** 2008. Destabilization of the Tar Hairpin Affects the Structure and Function of the Hiv-1 Leader Rna. *Nucleic Acids Res* 36(13): 4352-63.
747. **Wagner TA, Frenkel LM.** 2006. Clinical Significance of Hiv-1 Drug Resistance Mutations: Testing for Hiv-1 Drug Resistance. *Laboratory Medicine* 37 (9): 554-61.
748. **Waheed U, Hayat K, Ahmad B, Waheed Y, Zaheer HA.** 2013. Evaluation of Hiv/Aids Diagnostics Kits and Formulation of a Testing Strategy for Pakistan. *J Clin Virol* 56(4): 367-9.
749. **Wainberg MA, Brenner BG.** 2012. The Impact of Hiv Genetic Polymorphisms and Subtype Differences on the Occurrence of Resistance to Antiretroviral Drugs. *Mol Biol Int* 2012: 256982.
750. **Walker N, Garcia-Calleja JM, Heaton L, Asamoah-Odei E, Poumerol G, Lazzari S, Ghys PD, Schwartlander B, Stanecki KA.** 2001. Epidemiological Analysis of the Quality of Hiv Sero-Surveillance in the World: How Well Do We Track the Epidemic? *AIDS* 15(12): 1545-54.
751. **Wang Y, Song A, Xu S, Li X, Chong H, Zhao C, Nie J, Zhang C.** 2008. Impact of Hiv-1 Genetic Diversity in China on the Measurement of Viral Load. *J Med Virol* 80(1): 1-8.
752. **Ward MJ, Lycett SJ, Kalish ML, Rambaut A, Leigh Brown AJ.** 2013. Estimating the Rate of Intersubtype Recombination in Early Hiv-1 Group M Strains. *J Virol* 87(4): 1967-73.
753. **Warrilow D, Meredith L, Davis A, Burrell C, Li P, Harrich D.** 2008. Cell Factors Stimulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcription in Vitro. *J Virol* 82(3): 1425-37.
754. **Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G.** 2008. The Impact of Hiv Tropism on Decreases in Cd4 Cell Count, Clinical Progression, and Subsequent Response to a First Antiretroviral Therapy Regimen. *Clin Infect Dis* 46(10): 1617-23.
755. **Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC.** 2008. Nonhuman Primate Models and the Failure of the Merck Hiv-1 Vaccine in Humans. *Nat Med* 14(6): 617-21.
756. **Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM.** 1990. Fragments of the Hiv-1 Tat Protein Specifically Bind Tar Rna. *Science* 249(4974): 1281-5.

757. **Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al.** 1995. Viral Dynamics in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Nature* 373(6510): 117-22.
758. **Wen X, Casey Klockow L, Nekorchuk M, Sharifi HJ, de Noronha CM.** 2012. The Hiv1 Protein Vpr Acts to Enhance Constitutive Dcaf1-Dependent Ung2 Turnover. *PLoS One* 7(1): e30939.
759. **Wesolowski LG, Delaney KP, Meyer WA, 3rd, Blatt AJ, Bennett B, Chavez P, Granade TC, Owen M.** 2013. Use of Rapid Hiv Assays as Supplemental Tests in Specimens with Repeatedly Reactive Screening Immunoassay Results Not Confirmed by Hiv-1 Western Blot. *J Clin Virol* 58(1): 240-4.
760. **Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson JA, Hall HI.** 2010. Prevalence of Transmitted Drug Resistance Associated Mutations and Hiv-1 Subtypes in New Hiv-1 Diagnoses, U.S.-2006. *AIDS* 24(8): 1203-12.
761. **Whitcomb JM, Huang W, Limoli K, Paxinos E, Wrin T, Skowron G, Deeks SG, Bates M, Hellmann NS, Petropoulos CJ.** 2002. Hypersusceptibility to Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Hiv-1: Clinical, Phenotypic and Genotypic Correlates. *AIDS* 16(15): F41-7.
762. **Whitcomb JM, Parkin NT, Chappéy 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(7): 992-1000.
763. **White KL, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Miller MD, Naeger LK.** 2002. Molecular Mechanisms of Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Reverse Transcriptase Mutations K65r and K65r+M184v and Their Effects on Enzyme Function and Viral Replication Capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11): 3437-46.
764. **Wiesmann F, Vachta J, Ehret R, Walter H, Kaiser R, Sturmer M, Tappe A, Daumer M, Berg T, Naeth G, Braun P, Knechten H.** 2011. The L76v Mutation in Hiv-1 Protease Is Potentially Associated with Hypersusceptibility to Protease Inhibitors Atazanavir and Saquinavir: Is There a Clinical Advantage? *AIDS Res Ther* 8 7.
765. **Wilkinson D, Rutherford G.** 2001. Population-Based Interventions for Reducing Sexually Transmitted Infections, Including Hiv Infection. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD001220.
766. **Wills JW, Craven RC.** 1991. Form, Function, and Use of Retroviral Gag Proteins. *AIDS* 5(6): 639-54.
767. **Wirden M, Roquebert B, Derache A, Simon A, Duvivier C, Ghosn J, Dominguez S, Boutonnet V, Ait-Arkoub Z, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG.** 2006. Risk Factors for Selection of the L74i Reverse Transcriptase Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 50(7): 2553-6.
768. **Witvrouw M.** 2004. Novel Inhibitors of Hiv-1 Integration. *Current Drug Metabolism* 5(4): 291-304.
769. **Womack C, Roth W, Newman C, Rissing JP, Lovell R, Haburchak D, Essex M, Bond VC.** 2001. Identification of Non-B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes in Rural Georgia. *J Infect Dis* 183(1): 138-42.
770. **Wood MP, Cole AL, Ruchala P, Waring AJ, Rohan LC, Marx P, Tarwater PM, Gupta P, Cole AM.** 2013. A Compensatory Mutation Provides Resistance to Disparate Hiv Fusion Inhibitor Peptides and Enhances Membrane Fusion. *PLoS One* 8(2): e55478.
771. **Wooley DP, Smith RA, Czajak S, Desrosiers RC.** 1997. Direct Demonstration of Retroviral Recombination in a Rhesus Monkey. *J Virol* 71(12): 9650-3.
772. **Worobey M, Santiago ML, Keele BF, Ndjango JB, Joy JB, Labama BL, Dhed AB, Rambaut A, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH.** 2004. Origin of Aids: Contaminated Polio Vaccine Theory Refuted. *Nature* 428(6985): 820.
773. **Wrin T, Gamarnik A, Whitehurst N, Beauchaine J, Whitcomb JM, Hellmann NS, Petropoulos CJ.** 2001. Natural Variation of Replication Capacity Measurements in Drug-Naïve/Susceptible Hiv-1. *Antivir Ther* 6( suppl 1): 20.
774. **Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW.** 2003. Mutation Patterns and Structural Correlates in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Following Different Protease Inhibitor Treatments. *J Virol* 77(8): 4836-47.

775. **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.** 2010. Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to Hiv-1. *Science* 329(5993): 856-61.
776. **Xu H, Svarovskia ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebel K, Pathak VK.** 2004. A Single Amino Acid Substitution in Human Apobec3g Antiretroviral Enzyme Confers Resistance to Hiv-1 Virion Infectivity Factor-Induced Depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5652-7.
777. **Xu HT, Quan Y, Schader SM, Oliveira M, Bar-Magen T, Wainberg MA.** 2010. The M230I Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutation in Hiv-1 Reverse Transcriptase Impairs Enzymatic Function and Viral Replicative Capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 54(6): 2401-8.
778. **Xu XN, Laffert B, Scretton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, Mongkolsapay J, McMichael AJ, Baur AS.** 1999. Induction of Fas Ligand Expression by Hiv Involves the Interaction of Nef with the T Cell Receptor Zeta Chain. *J Exp Med* 189(9): 1489-96.
779. **Yang C, Dash BC, Simon F, van der Groen G, Pieniazek D, Gao F, Hahn BH, Lal RB.** 2000. 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* 181(5): 1791-5.
780. **Yang C, Li M, Mokili JL, Winter J, Lubaki NM, Mwandagalarwa KM, Kasali MJ, Losoma AJ, Quinn TC, Bollinger RC, Lal RB.** 2005. Genetic Diversification and Recombination of Hiv Type 1 Group M in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(7): 661-6.
781. **Yang H, Nkeze J, Zhao RY.** 2012. Effects of Hiv-1 Protease on Cellular Functions and Their Potential Applications in Antiretroviral Therapy. *Cell Biosci* 2(1): 32.
782. **Yang OO, Daar ES, Jamieson BD, Balamurugan A, Smith DM, Pitt JA, Petropoulos CJ, Richman DD, Little SJ, Brown AJ.** 2005. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade B Superinfection: Evidence for Differential Immune Containment of Distinct Clade B Strains. *J Virol* 79(2): 860-8.
783. **Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y.** 2003. Identification and Characterization of a New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombinants Comprised of Two Circulating Recombinant Forms, Crf07\_Bc and Crf08\_Bc, in China. *J Virol* 77(1): 685-95.
784. **Yang SJ, Lopez LA, Hauser H, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM.** 2010. Anti-Tetherin Activities in Vpu-Expressing Primate Lentiviruses. *Retrovirology* 7 13.
785. **Yang ZY, Chakrabarti BK, Xu L, Welcher B, Kong WP, Leung K, Panet A, Mascola JR, Nabel GJ.** 2004. Selective Modification of Variable Loops Alters Tropism and Enhances Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope. *J Virol* 78(8): 4029-36.
786. **Yap SH, Herman BD, Radzio J, Sluis-Cremer N, Tachedjian G.** 2012. N348i in Hiv-1 Reverse Transcriptase Counteracts the Synergy between Zidovudine and Nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 61(2): 153-7.
787. **Yebra G, de Mulder M, Martin L, Rodriguez C, Labarga P, Viciana I, Berenguer J, Aleman MR, Pineda JA, Garcia F, Holguin A.** 2012. Most Hiv Type 1 Non-B Infections in the Spanish Cohort of Antiretroviral Treatment-Naive Hiv-Infected Patients (Coris) Are Due to Recombinant Viruses. *J Clin Microbiol* 50(2): 407-13.
788. **Yeni P.** 2010. Prise En Charge Médicale des Personne infectées Par Le VIH. Recommandations Du Groupe D'experts. *Flammarion edn. Paris.*
789. **Yerly S, Rakik A, De Loes SK, Hirschel B, Descamps D, Brun-Vezinet F, Perrin L.** 1998. Switch to Unusual Amino Acids at Codon 215 of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Gene in Seroconvertors Infected with Zidovudine-Resistant Variants. *J Virol* 72(5): 3520-3.
790. **Yu XF, Dawson L, Tian CJ, Flexner C, Dettenhofer M.** 1998. Mutations of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 P6gag Domain Result in Reduced Retention of Pol Proteins During Virus Assembly. *J Virol* 72(4): 3412-7.

791. Zaccarelli M, Perno CF, Forbici F, Soldani F, Bonfigli S, Gori C, Trotta MP, Bellocchi MC, Liuzzi G, D'Arrigo R, De Longis P, Boumis E, Bellagamba R, Tozzi V, Narciso P, Antinori A. 2004. Q151m-Mediated Multinucleoside Resistance: Prevalence, Risk Factors, and Response to Salvage Therapy. *Clin Infect Dis* 38(3): 433-7.
792. Zachary D, Mwenge L, Muyoyeta M, Shanaube K, Schaap A, Bond V, Kosloff B, de Haas P, Ayles H. 2012. Field Comparison of Oraquick Advance Rapid Hiv-1/2 Antibody Test and Two Blood-Based Rapid Hiv Antibody Tests in Zambia. *BMC Infect Dis* 12 183.
793. Zeh C, Oyaro B, Vandenhoudt H, Amornkul P, Kasembeli A, Bondo P, Mwaengo D, Thomas TK, Hart C, Laserson KF, Ondoa P, Nkengasong JN. 2011. Performance of Six Commercial Enzyme Immunoassays and Two Alternative Hiv-Testing Algorithms for the Diagnosis of Hiv-1 Infection in Kisumu, Western Kenya. *J Virol Methods* 176(1-2): 24-31.
794. Zelina S, Sheen CW, Radzio J, Mellors JW, Sluis-Cremer N. 2008. Mechanisms by Which the G333d Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Facilitates Dual Resistance to Zidovudine and Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1): 157-63.
795. Zhan P, Liu X, Li Z, Pannecouque C, De Clercq E. 2009. Design Strategies of Novel Nnrtis to Overcome Drug Resistance. *Curr Med Chem* 16(29): 3903-17.
796. Zhang H, Dornadula G, Orenstein J, Pomerantz RJ. 2000. Morphologic Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions Secondary to Intravirion Reverse Transcription: Evidence Indicating That Reverse Transcription May Not Take Place within the Intact Viral Core. *J Hum Virol* 3(3): 165-72.
797. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. 2011. The Impact of Next-Generation Sequencing on Genomics. *Journal of genetics. and genomics = Yi chuan xue bao* 38 (3): 95-109.
798. Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmaso EA, Fu S, Pham T, Mei J, Ho JJ, Zhang W, Lopez P, Ho DD. 2002. Contribution of Human Alpha-Defensin 1, 2, and 3 to the Anti-Hiv-1 Activity of Cd8 Antiviral Factor. *Science* 298(5595): 995-1000.
799. Zhang XQ, Sorensen M, Fung M, Schooley RT. 2006. Synergistic in Vitro Antiretroviral Activity of a Humanized Monoclonal Anti-Cd4 Antibody (Tnx-355) and Enfuvirtide (T-20). *Antimicrob Agents Chemother* 50(6): 2231-3.
800. Zhang Y, Lu L, Ba L, Liu L, Yang L, Jia M, Wang H, Fang Q, Shi Y, Yan W, Chang G, Zhang L, Ho DD, Chen Z. 2006. Dominance of Hiv-1 Subtype Crf01\_Ae in Sexually Acquired Cases Leads to a New Epidemic in Yunnan Province of China. *PLoS Med* 3(11): e443.
801. Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, Vasudevachari MB, Salzman NP. 1997. Drug Resistance During Indinavir Therapy Is Caused by Mutations in the Protease Gene and in Its Gag Substrate Cleavage Sites. *J Virol* 71(9): 6662-70.
802. Zhang Z, Xu W, Koh YH, Shim JH, Girardet JL, Yeh LT, Hamatake RK, Hong Z. 2007. A Novel Nonnucleoside Analogue That Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Resistant to Current Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 51(2): 429-37.
803. Zhao J, Tang S, Ragupathy V, Gaddam D, Wang X, Zhang P, Nyambi PN, Hewlett I. 2012. Crf22\_01a1 Is Involved in the Emergence of New Hiv-1 Recombinants in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 60(4): 344-50.
804. Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. 1996. Zinc Folds the N-Terminal Domain of Hiv-1 Integrase, Promotes Multimerization, and Enhances Catalytic Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(24): 13659-64.
805. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD. 2010. Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of Hiv-1 by Antibody Vrc01. *Science* 329(5993): 811-7.
806. Ziermann R, Limoli K, Das K, Arnold E, Petropoulos CJ, Parkin NT. 2000. A Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease, N88s, That Causes in Vitro Hypersensitivity to Amprenavir. *J Virol* 74(9): 4414-9.

## VIH/SIDA en Mauritanie : de la surveillance épidémiologique à la résistance aux antirétroviraux.

### RESUME

La situation du VIH/SIDA en Mauritanie est très peu documentée et depuis 2001 le suivi de l'épidémie a reposé essentiellement sur la surveillance sentinelle chez les femmes en consultation prénatale (CPN). Sept années après la mise en place de cette surveillance sérologique, la surveillance de seconde génération beaucoup plus informative n'avait pas encore été conduite dans le pays. De même, depuis la mise en place de la thérapeutique antirétrovirale en 2005, l'efficacité des antirétroviraux (ARV) et la diversité génétique n'avaient jamais été documentées et la seule plateforme de Charge Virale (CV) disponible dans le pays avait été utilisée dans le suivi des patients sans évaluation préalable. C'est pour répondre à ces préoccupations que nos travaux de thèse ont porté sur les 4 thématiques suivantes : **(1) la surveillance sentinelle chez les femmes enceintes en CPN de 2001-2007** qui a montré une prévalence moyenne annuelle inférieure à 1% avec une évolution stable sur la période d'étude [ $p\text{-value} = 0.396$ ]. Après plusieurs années de surveillance uniquement basée sur la sérologie qui ne permettait pas d'expliquer les causes d'une prévalence observée, il s'avérait nécessaire de s'orienter vers la surveillance de seconde génération d'où notre **travail de (2) surveillance sérologique et socio-comportementale chez les consultants pour Infections Sexuellement transmissibles (IST)** qui a permis de documenter la prévalence du VIH, les connaissances, comportements, attitudes et pratiques (CCAP) de ce groupe face au VIH/SIDA. Ce travail a révélé une séroprévalence élevée (9%) associée à des CCAP qui permettent de conclure sur la haute vulnérabilité du groupe au VIH. Ces études de séroprévalence ont accéléré la politique d'accès aux ARV et confirmé la nature concentrée de l'épidémie en Mauritanie. Cependant elles ne suffisent pas pour une bonne documentation locale de la situation du VIH/SIDA d'où la nécessité de les compléter par des données sur l'épidémiologie moléculaire du VIH et la résistance aux ARV ; ceci a mené à l'étude sur les **(3) profils des mutations de résistance (MDR) aux antirétroviraux (ARV) et la diversité génétique chez les patients VIH-1 traités de la cohorte nationale de santé publique**. Ce travail a montré un taux élevé (72.30%) de résistance aux ARV chez les patients en échec virologique après une médiane de suivi de 32 mois. Les MDR les plus rencontrées étaient la M184V/I et les TAM pour les INRT et la K103N et Y181C pour INNRTI. Pour le traitement de deuxième ligne, le taux de MDR était faible, mais l'échantillon (6 patients) n'était pas représentatif. Une association entre la durée du traitement et l'accumulation des mutations a été trouvée avec une différence significative pour la M184V [ $p = 0.035$ ]. L'analyse phylogénétique des souches de VIH-1 a montré une prédominance du CRF02\_AG (64.6%). Les résultats obtenus soulignent l'intérêt de la mise en place d'un monitoring virologique structuré et un dispositif d'aide à l'observance. La grande diversité du VIH et le défaut de quantification par certaines techniques des variants non B, en particulier le CRF02\_AG prédominant dans notre contexte, interpelle sur l'intérêt de l'évaluation de la seule technique de charge virale (CAP-CTM, Roche) disponible en Mauritanie, ce qui a fait l'objet de notre travail **(4) sur la comparaison de 4 techniques de CV dont CAP-CTM**. Les résultats de cette étude ont montré une bonne corrélation entre la technique de référence (m2000 rt/sp) et CAP-CTM ce qui conforte son utilisation en Mauritanie pour le suivi des patients sous ARV.

### HIV/AIDS in Mauritania: from epidemiological surveillance to antiretroviral drug resistance

### ABSTRACT

The situation of HIV/AIDS in Mauritania is poorly documented and since 2001 the epidemic monitoring was mainly based on sentinel surveillance among Pregnant Women Attending Antenatal Clinics (PWAAC). Seven years after the first serological surveillance, the second generation surveillance which is more informative has not been conducted yet in the country. Moreover, since the beginning of Antiretroviral Therapy (ART) in 2005, the efficacy of ARV drugs and HIV genetic diversity has never been documented and the only available Viral Load (VL) platform in the whole country had been used for the monitoring of patients without any prior assessment. In order to address these concerns, our thesis work has focused on four themes: **(1) HIV sentinel surveillance among PWAAC from 2001 to 2007** which showed an average prevalence of less than 1% with a stable evolution for the study period [ $p\text{-value} = 0.396$ ]. After several years of this surveillance based only on serology which do not explain the causes of an observed prevalence it has become necessary to move to the second generation surveillance which combines serology and behavior and therefore explains better the causes of observed prevalence. This justified our second theme **(2) on the second generation surveillance among patient consulting for Sexually transmitted infections (STIs)** which has permitted us to document the prevalence, knowledge, behaviors, attitudes and practices (NBAP) explaining the risk of this group to HIV/AIDS. This work has revealed a high prevalence of 9% associated with NBAP that confirmed the high vulnerability of this group to HIV infection. These prevalence studies have accelerated the policy to ARV access and confirmed the concentrated nature of the epidemic in Mauritania. However these data are not sufficient for good local documentation of the HIV situation in the country and need to be completed with molecular epidemiology and HIV drug resistance data. That is the reason of the study on **(3) drug resistance mutations (DRM) profiles and genetic diversity in HIV-1 patients treated in the national public health cohort**. This study showed a high rate (72.30 %) of DRM among patients with virologic failure after a median follow-up of 32 months. The most common DRM were M184V/I and TAM for NRTIs and K103N and Y181C for INNRTI. For the second line regime, the DRM rate was low, but the sample (6 patients) was not representative. An association between the treatment duration and the accumulation of mutations was found with a significant difference for M184V [ $p=0.035$ ]. The phylogenetic analysis of HIV-1 strains showed a predominance of CRF02\_AG (64.6%). These results underline the necessity to set up a structured virological monitoring system and compliance support. The great diversity of HIV and the lack of quantification through some techniques of non-B variants, particularly the CRF02\_AG which is predominant in our context, require the evaluation of the unique viral load technique (CAP-CTM, Roche) available in Mauritania, which has been the last part of our work on **(4) the comparison of four viral load techniques including CAP-CTM**. The results of this study showed a good correlation between the reference technique (m2000rt/sp) and CAP-CTM comforting its use in Mauritania for the monitoring of HIV infected patients on ART.

**Key Words :** prevalence, Pregnant Women, consulting for STD, HIV-1 diversity, secondary resistance, viral load.

**Mots clefs :** prévalence, femme enceinte, consultants IST, diversité du VIH-1, résistance secondaire, charge virale.

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

Discipline : Biologie et Pathologies Humaines.