UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

✡✡✡✡✡

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

✡✡✡✡✡

ANNEE 2019 **N° 01**

LE VIH CHEZ LES HOMMES AYANT DES RAPPORTS SEXUELS AVEC D'AUTRES HOMMES AU SENEGAL: Résistance du VIH aux antirétroviraux

MEMOIRE

MASTER DE MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Présenté et soutenu Publiquement

Le 02 Février 2019

PAR

Docteur Yacine Amet DIA

Née le 23 août 1988 à Kaolack (Sénégal)

MEMBRES DU JURY

Président :	**M.**	**Cheikh Saad-Bouh**	**BOYE**	**Professeur Titulaire**
Membres :	**Mme**	**Ndeye Coumba**	**TOURE-KANE**	**Professeur Titulaire**
	M.	**Makhtar**	**CAMARA**	**Professeur Titulaire**
	Mme	**Halimatou**	**DIOP-NDIAYE**	**Professeur Assimilé**
	Mr	**Abdoulaye**	**SECK**	**Maître de Conférences Agrégé**
Directrice :	**Mme**	**Ndeye Coumba**	**TOURE-KANE**	**Professeur Titulaire**
Co- directrice :	**Mme**	**Nafissatou**	**LEYE DIOUF**	**Biologiste**

A Allah l'Omniscient, l'Omnipotent, l'Omniprésent de m'avoir donné la force pour mener à bien ce travail

Au prophète Mahomet (PSL) de m'avoir frayé le droit chemin

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Ndeye Coumba TOURE-KANE pour m'avoir accueillie dans son Unité de Biologie moléculaire.
Cher Maître, les mots me manquent aujourd'hui pour vous dire merci. Votre grand amour pour la science, la qualité de vos enseignements et votre remarquable fibre maternelle nous ont marqués. Je suis fier d'être l'un de vos nombreux étudiants et filleuls. Je vous en témoigne toute ma gratitude.

A Madame le Professeur Halimatou DIOP-NDIAYE qui nous a permis de réaliser ce travail grâce à son suivi minutieux. Veiller recevoir cher maître l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Makhtar CAMARA pour sa disponibilité, sa rigueur au travail associées à une gentillesse remarquable et l'attention particulière qu'il a porté sur notre cursus académique.
Cher maître, C'est un honneur que vous nous faite en acceptant de juger ce travail. Trouver ici nos sincères remerciements et l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Abdoulaye SECK pour sa rigueur scientifique, son franc parler et sa dévotion à la transmission du savoir. C'est ici l'occasion pour nous de vous rendre un vibrant hommage.
Veuillez accepter cher maître l'expression de nos sincères remerciements

Je remercie le Dr Nafissatou Léye DIOUF, mon encadreur pour l'effort fourni dans l'élaboration de ce travail de mémoire, ses conseils et sa disponibilité

Je remercie dans l'ensemble tous nos encadreurs du Master de Microbiologie Fondamentale et appliquée.
Je tiens également à remercier l'ensemble des collaborateurs du projet HP2 et toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au laboratoire de bactériologie virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec spécialement ceux de l'unité de biologie moléculaire ainsi que le personnel de la plateforme de Biologie moléculaire de l'IRESSEF, pour leur sympathie et leur aide, scientifique ou non sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est.

Je remercie enfin toute ma famille pour son soutien sans faille particulièrement mon époux **Abdou PADANE, mes parents Yoro Amet DIA et Astou Sy DIAW,** toute la famille **DIA et PADANE.**

Je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble des patients ayant participé à ce projet qui nous a permis de réaliser cette étude.

LISTE DES ABREVIATIONS

3TC : Lamivudine

ABC : Abacavir

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANRS : Agence National de Recherche sur le SIDA et les hépatites

APOBEC3 : Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ARV : Antirétroviral

ASV : Avian Sarcoma Virus

ATV/r : Atazanavir boosté par le ritonavir

AZT : Atazanavir

CA : Capside

CCR5 : Chemokine CC motif Receptor 5

CD4 : Cluster of differenciation 4

CD8 : Cluster of differenciation 8

CDC : Center for Disease Control and prevention

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNLS : Comité national de lutte contre le SIDA

CNR : Centre National de Référence

CPI : Complexe de pré-intégration

CRF : Circulating Recombinant Form

CV : Charge Virale

CXCR4 : Chemokine CXC motif Receptor 4

CYP3A4 : Cytochrome P3A4

d4T : Stavudine

DBS : Dried blood spot

DRM : Mutation de résistance

DRV/r : Duranavir boosté par le ritonavir

DTG : Dolutégravir

EDTA : Ethylene Diamine tetra-acetic Acid

EFV : Efavirenz

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

env : Enveloppe

FDA : Food and Drug Administration

FTC : Emtricitabine

gag : Antigéne de groupe

GP : Glycoprotéine

GP120 : Glycoprotéine 120

HSH : Hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes

HTLV-1 : Human T-Cell Leukemia Virus-1

HTLV-2 : Human T-Cell Leukemia Virus-2

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

Ig : Immunoglobuline

IN : Intégrase INNTI : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse

INTI : Inhibiteur Nucléos(t)idique de la Transcriptase Inverse

IP : Inhibiteur de la protéase

LPV/r : Lopinavir boosté par le ritonavir

LTR : LongTerminal Repeat

MA : Matrice

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

NASBA : Nucleic Acid Sequence Based Amplification

NC : Nucléocapside nef : Negative factor

NVP : Nevirapine

OMD : Objectifs du millénaire pour le développement

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P24 : Protéine 24

Pb : Paire de base

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PCR : Polymerisation chain reaction

pol : Polymérase

PR : Protéase

PreP : Prophylaxie pré-exposition

QIG : Quotient d'Inhibition Génotypique

RAV : Rous Associated Virus

RER : Réticulum Endoplasmique Rugeux

rev : Regulator of expression of the virion

RSV : Rous Sarcoma Virus RT : Reverse transcriptase

RT-PCR : Reverse transcriptase – Polymerisation chain reaction

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Humaine

SIV : Virus de l'immunodéficience simienne

SU : Surface

TAM : Thymidine Analogue mutation

TAR : Traitement antirétroviral

TasP : Treatement as prevention

tat : Transactivator of transcription

TDF : Tenofovir

TI : Transcriptase Inverse

TM : transmembranaire

U3 : Unique en 3'

U5 : Unique en 5'

vif : virus infectivity factor

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

vpr : Viral protein r

vpu : Viral protein u

vpx : Viral protein x

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VIH-1 8
Figure 2 : Organisation génomique de VIH-1 et VIH-2 9
Figure 3 : schéma de la fixation (3a) et de l'entrée du VIH (3b) 11
Figure 4 : schéma de la transcription inverse 12
Figure 5 : schéma de l'entrée de l'ADN (5a) dans le noyau et son intégration (5b) 13
Figure 6 : schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral 13
Figure 7 : assemblage (7a) et bourgeonnement (7b) des nouveaux virions 14
Figure 8 : évolution de la charge virale (CV) ARN du VIH et du nombre de CD4 pendant l'infection à VIH et après la mise sous traitement antirétroviral (TAR). 16
Figure 9 : cibles thérapeutique et cycle de réplication du VIH 20
Figure 10 : Mécanismes de résistance aux INTI 27
Figure 11 : mécanisme de résistance aux INNTI 28
Figure 12 : Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs 29
Figure 13 : Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs. 29
Figure 14 : Principales étapes de réalisation du génotypage de résistance 36
Figure 15 : Exemple de vérification du produit de PCR de fragment de la RT 43
Figure 16 : Répartition des patients en fonction de la charge virale ARN VIH plasmatique . 50
Figure 17 : Arbre phylogénétique des souches au niveau de la RT et de la PROT 51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Choix préférentiels pour un premier traitement antirétroviral 19
Tableau II : Différents schémas thérapeutiques utilisés dans la prise en charge d'une infection à VIH..... 19
Tableau III : Caractéristiques des principales INTIs..... 22
Tableau IV : Principales caractéristiques des INNTIs..... 23
Tableau V : Caractéristiques des principales IPs..... 24
Tableau VI : Caractéristiques des INIs..... 25
Tableau VII : Algorithme d'interprétation des tests génotypiques des résistances aux INTI *dernière mise à jour 11/2018* 31
Tableau VIII : Algorithme d'interprétation des tests de résistance aux INNTI 32
Tableau IX : Algorithme d'interprétation des tests génotypiques de résistance aux IP 33
Tableau X : Listes des mutations associées à une résistance à la T20..... 34
Tableau XI : Description générale de la population d'étude 46
Tableau XII : Répartition des participants selon leur statut sérologique..... 47

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH **4**
I. RAPPELS SUR LE VIH 5
1. Définition et classification du VIH 5
2. Origines du VIH 6
3. Morphologie, Structure et Organisation génomique 8
3.1. Morphologie et structure 8
3.2. Organisation génomique 9
3.2.1. Gènes de structure du VIH : gag, pol et env. 9
3.2.2. Gènes régulateurs et accessoires du VIH : 10
4. Cycle de réplication virale : 11
5. Diagnostic biologique et suivi immuno-virologique de l'infection : 14
II. DIVERSITE GENETIQUE 16
III. TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL ET RESISTANCE DU VIH AUX ARV 18
1. Classe et mécanismes d'action des ARV 20
1.1. Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs) 20
1.2. Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs) : 22
1.3. Inhibiteurs de la protéase (IPs) 23
1.4. Inhibiteurs d'entrée 24
1.5. Inhibiteurs d'intégrase (INIs) 25
2. Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales 26
2.1. Définition de la notion de résistance 26
2.2. Mécanismes de résistance et mutations associées 26
2.2.1. Mécanismes de résistance 26
2.2.1.1. Mécanismes de résistance aux INTI 26
2.2.1.2. Mécanismes de résistance aux INNTI 27
2.2.1.3. Mécanismes de résistance aux IPs 28
2.2.1.4. Mécanismes de résistance aux INIs 29
2.2.1.5. Autres mécanismes de résistance 30
2.2.2. Mutations associées à la résistance aux ARV 31

3. Analyse et interprétation de la résistance 34
3.1. Généralités sur les tests de résistance 34
3.2. Interprétation des mutations de résistance : 37
DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE 39
I. METHODOLOGIE 40
1.1. Cadre, population de l'étude et critères de sélection des participants 40
1.1.1. Cadre de l'étude 40
1.1.2. Population d'étude 40
Par rapport aux critères de sélection des participants 40
1.2. Prélèvements et Conservation 41
1.3. Taille des échantillons 41
1.4. Analyses au laboratoire 41
1.4.1. Quantification de l'ARN viral du VIH 41
1.4.2. Tests génotypiques de résistance 42
1.4.2.1. Extraction de l'ARN viral 42
1.4.2.2. Amplification de l'ADN viral 42
1.4.2.3. Purification 43
1.4.2.4. Analyse des données de séquençage 44
1.4.2.4.1. Principe du séquençage 44
1.4.2.4.2. Correction et analyse des séquences 45
1.4.2.4.3. Alignement des séquences et la phylogénie 45
1.4.3. Analyses statistiques des données 45
II. RÉSULTATS 46
1. Caractéristiques démographiques de la population d'étude 46
2. La charge virale 48
3. Génotypage de résistance 48
III. DISCUSSION 51
1. Population d'étude 51
2. La charge virale 52
3. Génotypage de résistance 52
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 55
REFERENCES 58

INTRODUCTION

L'émergence de la pandémie du VIH/SIDA a marqué la santé mondiale au cours de ces trente dernières années, le VIH/SIDA est devenu un enjeu majeur de santé publique et de développement humain. En effet selon le dernier rapport de l'OMS 36.9 millions [31,1 millions - 43,9 millions] de personnes vivaient avec le VIH en 2017 dont près de 70% (25,6 millions) (Rapport CNLS/ONUSIDA, 2017) en Afrique subsaharienne.

La lutte contre l'épidémie du VIH/SIDA a été inscrite comme l'un des objectifs du millénaire pour le développement (OMD) édicté par l'Assemblée générale des Nations-Unies (ONUSIDA, 2006) et soulève de multiples défis humains, socio-économiques, scientifiques, médicaux et éthiques.

Grâce à cette forte mobilisation de la communauté internationale, axée à la fois sur la prévention et le traitement antirétroviral, de nombreuses épidémies nationales ont considérablement évolué au cours de ces dix dernières années.

En 2017, 21,7 millions [19,1 millions - 22,6 millions] de personnes vivant avec le VIH avaient accès au traitement antirétroviral (ONUSIDA, 2017), soit une augmentation de 2,3 millions en 2016 et de 8 millions [7,1 millions - 8,3 millions] en 2010.

Au Sénégal (ONUSIDA/CNLS, 2017), l'infection à VIH chez les adultes (15 à 49 ans) a chuté de 0,7 à 0,5% de 2005 à 2017 avec une réduction du nombre de décès lié au VIH de 39.2% de 2014 à 2017 et une baisse de 44,2% des nouveaux cas d'infection (1358 à 758 cas).

Cependant, malgré les progrès réalisés dans la prévention et la prise en charge de l'infection à VIH, la couverture insuffisante ainsi que la faible qualité des services offerts à la population générale et aux populations clé en particulier continuent d'entraver la lutte contre le VIH.

En effet, les populations clés hautement exposées aux risques d'infection constituent l'épicentre de l'épidémie à VIH en Afrique subsaharienne (Rapport CNLS/ONUSIDA, 2015) : elles sont à l'origine (directement ou indirectement) de la majorité des cas de nouvelles infections : 7,19% au Sénégal. Selon les pays et les types de populations clés, les prévalences du VIH observées parmi ces populations clés sont de 2 à 50 fois plus élevées qu'en population générale adulte environnante.

Ainsi, ces populations clés influencent la dynamique de l'épidémie et jouent un rôle important dans la détermination de la nature et de l'efficacité de la riposte au VIH.

Aujourd'hui, la riposte au SIDA franchit une étape de plus « mettre fin à l'épidémie de SIDA d'ici à 2030 ». Pour cela, une nouvelle stratégie a été proposée par l'ONUSIDA à l'horizon 2020 à savoir, amener :

- 90% des personnes vivant avec le VIH à connaître leur statut sérologique
- 90% de toutes ces personnes devant recevoir un traitement anti rétroviral régulier
- 90% des personnes recevant un traitement antirétroviral à avoir une charge virale indétectable.

Ce projet ambitieux ne pourra être réalisé sans cibler les populations clés particulièrement les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSHs) et leur accorder des interventions adaptées à leur condition afin de surmonter les obstacles d'accès aux services de santé.

En règle générale, il existe moins de données sur la santé globale des populations clés notamment la prévalence du VIH en raison de diverses complexités relatives à :

- l'échantillonnage,
- aux questions juridiques,
- à la stigmatisation et à la discrimination.

Tout cela justifie l'intérêt et l'importance de ce travail qui tentera de faire l'état de la situation de l'infection à VIH au Sénégal chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH) surtout que le risque de contracter le VIH est 27 fois plus élevé dans cette population clé mais également sur l'efficacité du traitement antirétroviral qui leur est administré.

En effet cette étude a pour objectif général de :

- Evaluer la prévalence des mutations de résistance du VIH-1 aux ARVs chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes au Sénégal

Et comme objectifs spécifiques de :

- Déterminer la prévalence du VIH chez les HSHs au Sénégal
- Déterminer le taux de résistance primaire et secondaire
- Connaitre la diversité génétique du VIH chez les HSHs au Sénégal

Par ailleurs, ce travail est issu du projet HP2.0 dont le but est d'examiner le lien entre l'infection à VIH chez les populations clés en particulier chez les (HSHs) et la stigmatisation en tant que facteur de risque. Cette stigmatisation envers cette population clé est répandue et influence la

prévention du VIH et l'utilisation des services de santé par ces derniers : un groupe fortement touché en raison de facteurs de risque biologiques et comportementaux spécifiques.

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

- Une première partie de rappels sur la biologie du VIH, la diversité génétique, le traitement antirétroviral (ARV), la résistance aux ARV et ses différentes techniques d'études,
- Une deuxième partie relatant la méthodologie utilisée et les résultats obtenus,
- Une discussion des résultats, une conclusion générale, des perspectives et quelques recommandations viendront clore ce document.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH

I. RAPPELS SUR LE VIH

1. Définition et classification du VIH

Le VIH est un lentivirus appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Les *Retroviridae* (ou Rétrovirus) constituent une vaste famille de virus à ARN simple brin de polarité positive et de haut poids moléculaire (environ 10 Kb) caractérisée par la présence d'une enzyme structurale, la transcriptase inverse (TI) et par leur mode de réplication. La transcriptase inverse est capable de synthétiser, à partir de l'ARN viral, un ADN double brin qui va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Il se réplique alors en même temps que le génome de la cellule hôte (**Girard et al, 2011**).

Actuellement, la famille des Rétrovirus a été divisée en sept genres par l'ICTV :
International Committee on Taxonomy of Viruses (*http://ictvonline.org*).
Cette classification est basée essentiellement sur la comparaison des séquences du gène *pol*.

On distingue les:

- *Alpha-Rétrovirus* (Rétrovirus type C aviaires)
- *Beta-Rétrovirus* (Rétrovirus type B mammifères)
- *Gamma-Rétrovirus* (Rétrovirus type C)
- *Delta-Rétrovirus* (BLV-HTLV)
- *Epsilon-Rétrovirus* (Rétrovirus type D)
- *Lentivirus* et les *Spumavirus*

Les *Lentivirus*, dont le VIH-1 sont caractérisés par une longue période d'incubation, d'où leur nom lentivirus qui vient du latin lentis signifiant lent. Ils sont tous cytopathogènes et sont responsables d'atteintes du système nerveux, des poumons, des systèmes articulaires et des cellules hématopoiétiques.
Le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) est causé chez l'homme par deux lentivirus, le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 et 2 (VIH-1 et VIH-2).
Le SIDA a été reconnu pour la première fois comme nouvelle maladie en 1981 lorsqu'un nombre important d'homosexuels ont succombé d'infections opportunistes et de rares cancers (**CDC 1981; Greene 2007**). Un rétrovirus, nommé VIH-1, a par la suite été identifié comme étant l'agent causal de l'infection qui dès lors devient l'une des maladies infectieuses émergentes les plus dévastatrices de l'histoire (**Barre-Sinoussi et al. 1983**; **Gallo et al. 1984**; **Popovic et al. 1984**). Le VIH-1 se transmet par voie sexuelle, sanguine et verticale (Mère-enfant) (**Hladik et McElrath 2008; Cohen et al. 2011**).

2. Origines du VIH

L'origine du VIH-1 chez les primates non-humains a été tracée à travers le virus simien du chimpanzé SIVcpz, qui a infecté des communautés de chimpanzés isolées au sud du Cameroun. L'ancêtre du VIH-1 est probablement passé des chimpanzés à l'humain par transmission hématogène. L'analyse phylogénétique du VIH-1 et des virus apparentés des primates non humains suggère que quatre évènements de transmission indépendante inter-espèce précoce durant le 21ème siècle n'ont pas toutes eu la même issue virologique et épidémiologique.
En effet, seul le VIH-1 groupe *major* M, découvert en 1983, a diffusé à l'échelle mondiale et est responsable de la pandémie qui touche aujourd'hui plus de 21 millions de personnes dans le monde.

Le VIH-1 groupe *outlier* O a été identifié au début des années 1990 chez des patients camerounais et est limité à une épidémie restreinte dans la région du bassin du Congo où il représente moins de 1 % des infections VIH-1. Des données au Cameroun suggèrent que la prévalence du VIH-1 O reste stable autour de 1 %.

Le VIH-1 *non major-non outlier* N, décrit en 1998, et le VIH-1 P, décrit en 2009, ont été observés chez très peu d'individus. (**Martine Peeters et Marie Laure Chaix, 2013**)

Bien que les souches apparentées aux groupes M et N aient été découvertes chez les chimpanzés, une preuve récente suggère que le VIH- 1 groupe O serait originaire des gorilles SIVgor, chez lesquelles les proches parents de ce groupe ont été identifiés. Il est supposé que les virus qui se propagent chez l'homme le long du fleuve Congo dans le Kinshasa au Zaire seraient le premier cas documenté d'infection à VIH (souche du groupe M) de l'homme à travers des analyses réalisées sur des prélèvements sanguins de 1959. Les données phylogénétiques existantes confortent que le VIH-1 groupe P serait originaire du gorille, mais trop peu de souches SIVgor avait été caractérisées pour identifier la région où cette transmission aurait eu lieu (**Hemelaar 2012**).

Les franchissements de la barrière d'espèce pour les groupes M, N et P ont certainement eu lieu dans le Sud du Cameroun où les réservoirs des ancêtres de ces trois variants viraux ont été retrouvés.

Cela coïncide avec la distribution géographique des infections VIH-1 N et P. La localisation de la transmission inter-espèce à l'origine du groupe O n'a pas encore été identifiée, mais pourrait se situer dans le Sud du Cameroun ou une région proche, correspondant à la zone épidémique. Néanmoins, pour le groupe M, l'épicentre de la pandémie est situé en RDC à plusieurs centaines

de kilomètres du Sud-Est du Cameroun. Diverses hypothèses existent pour expliquer cette différence de localisation entre l'origine du virus et l'origine de l'épidémie. Il s'agit probablement d'une combinaison de plusieurs facteurs liés au virus et aux conditions socioéconomiques et démographiques.

Il est clair que l'histoire naturelle de l'infection à VIH-2 diffère considérablement de celle du VIH1. La provenance du VIH-2 des mangabeys fumés a été énoncée pour la première fois en 1989 (**Hirsch et al. 1989**) et ensuite confirmé en démontrant que des humains en Afrique de l'Ouest hébergent les souches de VIH-2 qui ressemblait à l'infection locale à SIVsmm circulant. En effet, les homologies entre le VIH-2 et le SIVsmm ainsi que la coïncidence géographique entre l'épicentre de l'épidémie de VIH-2 et l'aire de répartition des mangabés enfumés confirment que les SIVsmm des mangabés sont les ancêtres du VIH-2 présent aujourd'hui chez l'Homme. La caractérisation de nombreuses souches de SIVsmm, provenant d'animaux sauvages ou captifs, a montré une très grande diversité génétique des SIVsmm au Libéria, en Sierra Leone et en Côte d'Ivoire. Une très grande diversité génétique est aussi observée parmi les souches VIH-2, constitué d'au moins huit groupes viraux (notés de A à H), correspondant à huit transmissions inter-espèces indépendantes. Un nouveau variant VIH-2 a été décrit chez un enfant vivant dans la forêt de Tai en Côte d'Ivoire et pourrait correspondre à une neuvième transmission inter-espèce (**Martine Peeters et Marie Laure Chaix, 2013**). La plupart des groupes (C à H) n'infectent que peu d'individus et ont été décrits essentiellement dans les zones rurales, où les habitants vivent au contact de ces animaux (chasse ou domestication).

Seuls les groupes A et B ont connu une diffusion épidémique en Afrique de l'Ouest. La Guinée-Bissau est l'épicentre du VIH-2 A, le groupe prédominant, qui circule dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest (Sénégal, Mali, Nigéria, Burkina Faso, Gambie, Côte d'Ivoire, etc.) ainsi qu'en Europe et, plus particulièrement, en France ou au Portugal qui possèdent des liens historiques avec ces pays. Le VIH-2 groupe B est moins prévalant et circule essentiellement en Côte d'Ivoire et au Ghana. Les ancêtres de ces deux groupes viraux ont été identifiés chez des mangabés enfumés sauvages de la forêt de Tai, en Côte d'Ivoire, proche de la frontière avec le Libéria. Les analyses de datation estiment que l'émergence du VIH-2 a eu lieu vers 1932 pour le groupe A (1906-1955) et 1935 pour le groupe B (1907-1961). L'épidémie de VIH-2 est limitée à l'Afrique de l'Ouest avec les prévalences les plus élevées au Sud du Sénégal (Casamance) et en Guinée-Bissau. En général, les prévalences sont restées faibles, avec une décroissance au cours du temps. Le VIH-2 est moins pathogène et moins transmissible que le virus pandémique, VIH-1 M. Le risque de transmission mère-enfant est très faible (< 2 %) et la

transmission sexuelle moins efficace certainement du fait de faibles charges virales. (**Martine Peeters et Marie Laure Chaix, 2013**).

3. Morphologie, Structure et Organisation génomique

3.1. Morphologie et structure

Il comprend de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 1) :

- Enveloppe : une bicouche lipidique dérivant de la membrane de la cellule hôte, contient deux glycoprotéines virales majeur, la glycoprotéine de surface (SU gp120) et la glycoprotéine transmembranaire (TM gp41). Ces deux protéines proviennent du clivage enzymatique de la pré-protéine gp160. L'enveloppe contient également plusieurs protéines membranaires dérivées de la cellule hôte, les antigènes du CMH, l'actine et l'ubiquitine.
- La protéine matrice, principalement constituée de la protéine Gag p17 (MA gp17) est ancrée à la face interne de l'enveloppe, elle comprend approximativement 2000 copies codées par le gène *gag*.
- La partie centrale du virion est occupée par le core (capside), constitué de la protéine CA, p24 d'environ 2000 copies, elle renferme deux ARN simple brin, linéaire, de polarité positive, d'environ 9,5kb, stabilisé par la protéine nucleocapsidique (NC, P7) avec laquelle elle forme un complexe ribonucléoprotéique ; elle contient également trois enzymes virales essentielle : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.

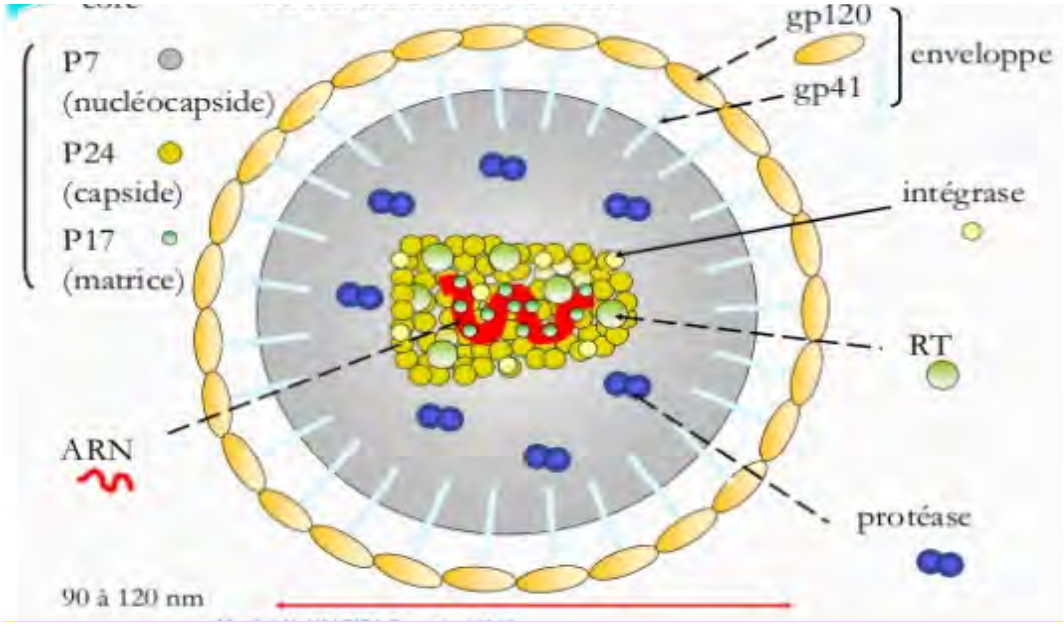


Figure 1 : Structure du VIH-1 (Tiré du traité de virologie médicale Pr J-M Huraux, 2003)

3.2. Organisation génomique

Le génome du VIH mesure environ 10 000 paires de base (pb) et il est composé de 9 cadres ouverts de lectures (Figure 2). Dans le sens 5' vers 3', il possède les trois gènes de structures communs à tous les rétrovirus : *gag* (pour antigène spécifique de groupe), *pol* (pour polymérase) et *env* (enveloppe). Il possède également deux gènes régulateurs *(tat* et *rev*), et quatre gènes accessoires (*nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* pour le VIH-1 ou *vpx* pour le VIH-2). Les extrémités du génome du VIH sont flanquées par deux longues séquences terminales répétées (LTR, Long terminal Repeat en anglais) d'environ 650 pb. Elles sont identiquement composées des régions uniques en 5' (U5) et 3' (U3), qui encadrent la région (LTR, Long terminal Repeat en anglais) (**Krebs et al., 2013**).

Elles permettent l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.

Le LTR en 5' sert de promoteur pour la transcription virale tandis que le LTR en 3' sert de signal de fin transcriptionnel. LTR en 3' active aussi la transcription de nef.

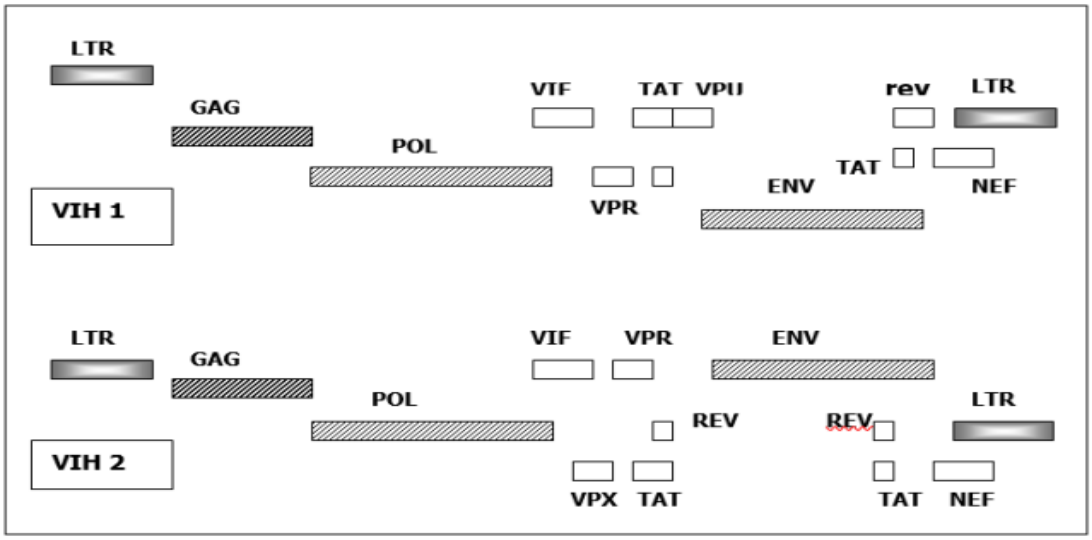


Figure 2 : Organisation génomique de VIH-1 et VIH-2

(*www.magazinescience.com* dernière mise à jour 03/12/2018**).**

3.2.1. Gènes de structure du VIH : *gag*, *pol* et *env*.

Le gène *gag* (environ 1 500 pb) code pour un précurseur polyprotéique Gag de 55 kDa (Pr55 Gag) (**Freed, 2015**). Les protéines de structures du VIH sont générées grâce au clivage de Pr55 Gag par la protéase virale, dans l'ordre des extrémités N-terminale vers C-terminale suivant : protéine de matrice (p17, MA), protéine de capside (p24, CA), peptide d'espace SP1, protéine de nucléocapside (p7, NC), peptide d'espace SP2, et protéine p6 résultante du clivage. Ces

protéines interviennent dans l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du virus. Brièvement, MA permet l'adressage et la liaison de Pr55 Gag à la membrane plasmatique cellulaire où a lieu l'assemblage (**Jouvenet et al., 2006**), ainsi que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe. CA guide la multimérisation de Pr55 Gag au cours de l'assemblage, et elle participe aussi à la formation de la capside. SP1 et NC interviennent aussi dans l'assemblage de Pr55 Gag. De plus, NC participe au recrutement et à l'encapsidation de l'ARN viral. Enfin, p6 recrute le complexe protéique ESRT (Endosomal sorting complex required for transport, en anglais) qui catalyse la fission de la membrane cellulaire et permet la libération du virion immature (**Carlton and Martin-Serrano, 2007**).

En association avec le gène *pol* (environ 3 000 pb), le gène *gag* peut aussi coder pour le précurseur polyprotéique Gag-Pol de 160 kDa (Pr160 Gag-Pol) (**Freed, 2015**). Le clivage de Pr160 Gag-Pol par la protéase (N-terminale vers C-terminale), génère Pr55 Gag ainsi que les trois protéines enzymatiques du VIH : protéase (p11, PR), rétro-transcriptase (p66/p51, RT), intégrase (p32, IN). Brièvement, PR permet le clivage de Pr55 Gag et Pr160 Gag-Pol au cours de la maturation du virus. L'inactivité de la protéase conduit à la production de particules virales immatures non infectieuses. RT converti l'ARN viral monocaténaire en ADN bicaténaire après son entrée dans la cellule. IN permet l'insertion de l'ADN néo-synthétisé dans le génome de la cellule hôte.

Le gène *env* (environ 2 500 pb) code pour le précurseur glycoprotéique 160 (gp160).

La gp160 est ensuite clivée par une protéase cellulaire en une glycoprotéine de surface 120 (gp120, SU) et en une glycoprotéine transmembranaire 41 (gp41, TM). La gp120, composée de 5 régions conservées (C1-C5) et 5 domaines hypervariables (V1-V5), qui forment des boucles à leur base et contiennent les sites de liaison pour le récepteur CD4 et co-récepteurs des chémokines (CCR5 ou CXCR4) (**Wilen et al., 2012**). Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont donc impliquées dans l'attachement, la fusion et la cytolyse au cours de l'entrée du virus dans la cellule.

3.2.2. Gènes régulateurs et accessoires du VIH :

Les gènes régulateurs tat et *rev* codent respectivement pour la protéine trans-activatrice *(tat*) et la protéine régulatrice de l'expression du VIH (*rev*) (**Adamson and Freed, 2010; Goodsell, 2012**). A l'intérieur de la capside, *tat* active l'élongation en se liant à la région TAR (Transactivation response region, en anglais) de l'ARNm (**Karn and Graeble, 1992**). *rev* joue

un rôle majeur dans le transport de l'ARNm viral du noyau vers le cytoplasme et il régule négativement l'expression de *tat*, *rev* et *nef*.

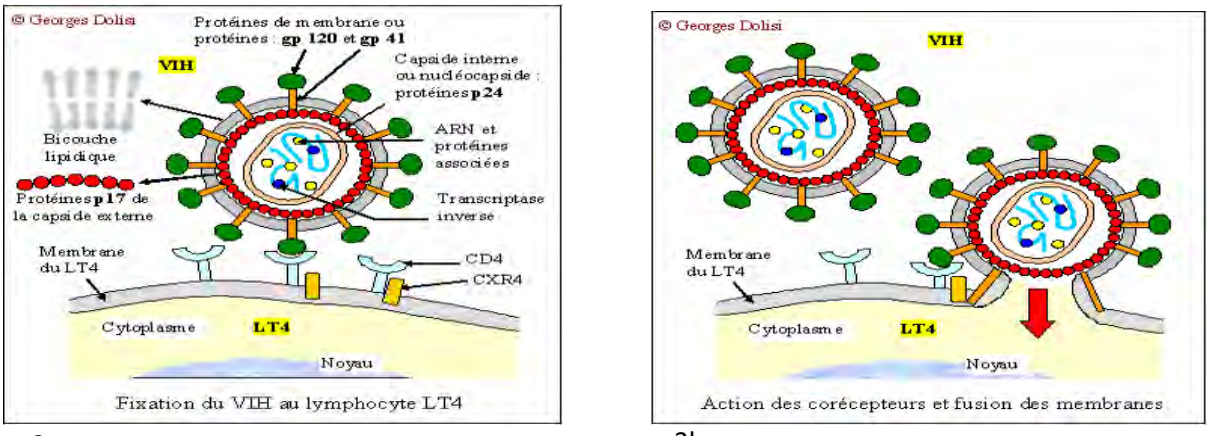
Les gènes accessoires ne sont pas essentiels à la réplication virale, contrairement aux gènes régulateurs. Les gènes *vif*, *vpr*, *vpu* (ou *vpx* pour le VIH-2) et nef codent respectivement pour le facteur d'infectivité virale (*vif*), les protéines virales R (*vpr*) ou X (*vpx*, pour le VIH-2) et U (*vpu*), ainsi que le facteur négatif (*nef*). Brièvement, dans le cytoplasme, Vif augmente significativement l'infectivité du virus, tandis que *vpr* facilite notamment l'import du complexe de pré-intégration (CPI) viral du cytoplasme de la cellule hôte vers le noyau. Dans l'enveloppe, *nef* augmente notamment la réplication et la pathogénicité du virus, tandis que *vpu* (ou *vpx* pour le VIH-2) active le relargage des virions immatures et induit la dégradation des CD4.

4. Cycle de réplication virale :

Le VIH est un rétrovirus qui a besoin d'intégrer le noyau de la cellule infectée pour détourner le fonctionnement cellulaire afin d'assurer sa réplication.

L'infection virale peut être découpée en plusieurs étapes majeures correspondant à la phase précoce du cycle de réplication du virus et aboutissant à la formation de nouveaux virions (**Rothe et al., 1996**).

- L'attachement (figure 3) du virus à la cellule hôte se fait par interaction spécifique entre la gp120 et son récepteur, la molécule CD4 (**Weiss, 1993**). Cette fixation induit des changements conformationnels permettant la reconnaissance de la gp120 par les co-récepteurs (**D'Souza et al., 1996).** Il y'a alors fusion entre la membrane virale et la membrane cytoplasmique cellulaire.



3a 3b

Figure 3 : schéma de la fixation du VIH (3a) et de l'entrée du VIH (3b)

[*http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/VIH.gif*] dernière mise à jour le 03/02/2016

- La Décapsidation et transcription inverse (figure 4) : Au cours de cet évènement, le virus est progressivement et partiellement désassemblé dans le cytoplasme. C'est à partir des complexes obtenus qu'a lieu dans le cytoplasme la transcription inverse du génome viral. Grace à un ARNt lysine comme amorce, la RT synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral et génère à chaque extrémité du génome de longues répétitions terminales identiques (Long Terminal Repeats, LTR). La RNAse H dégrade le brin d'ARN pendant qu'un deuxième brin d'ADN est constitué. Le génome viral s'associe avec des protéines cellulaires et virales en un complexe nucléoprotéique, le complexe de pré-intégration.

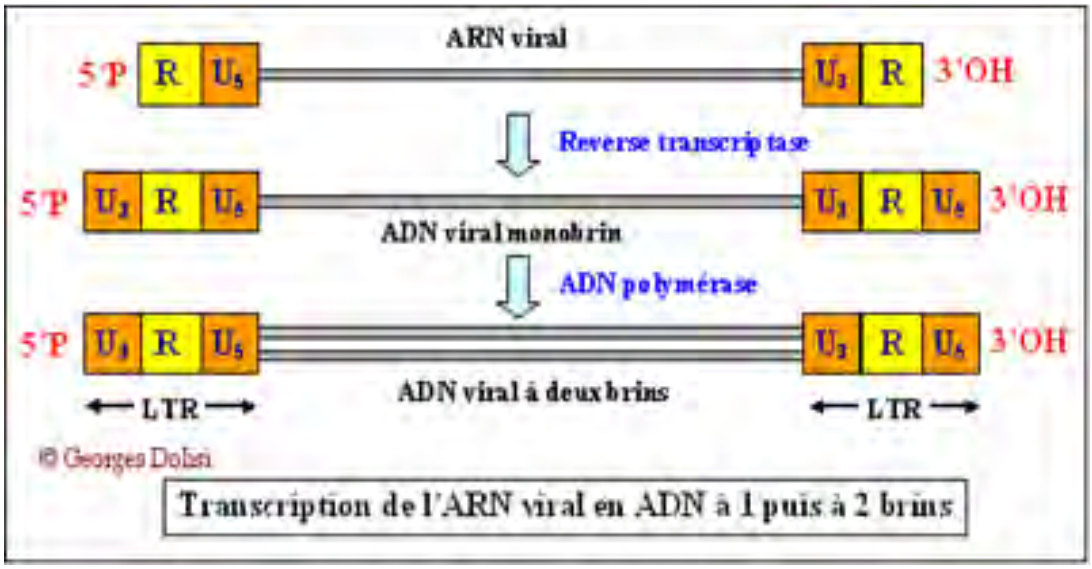
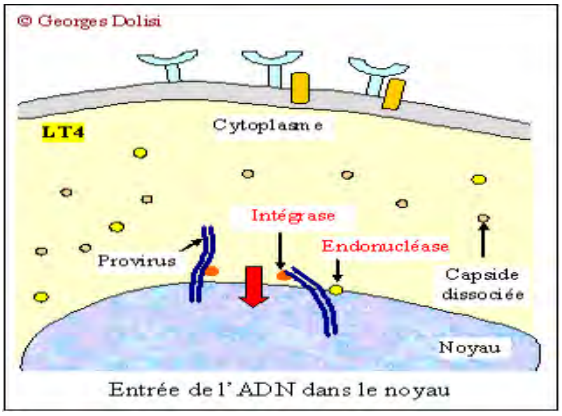
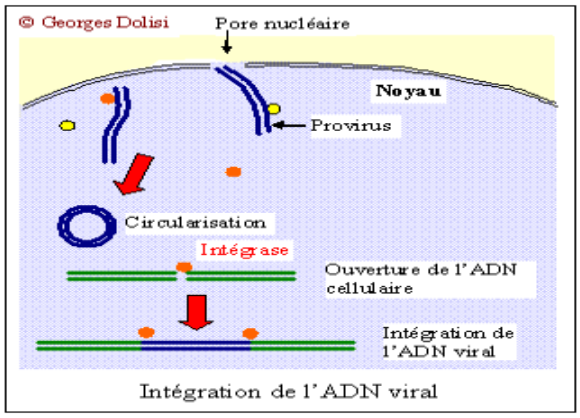


Figure 4 : schéma de la transcription inverse
[*http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/VIH.gif*]
dernière mise à jour le 03/02/2016

- L'import nucléaire, intégration (figure 5) : Après la transcription inverse, le génome viral est acheminé au noyau de la cellule. A la suite de l'import du complexe de pré-intégration au noyau, l'ADN viral est intégré dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée par l'action de l'intégrase virale. Le virus est alors sous sa forme de provirus.



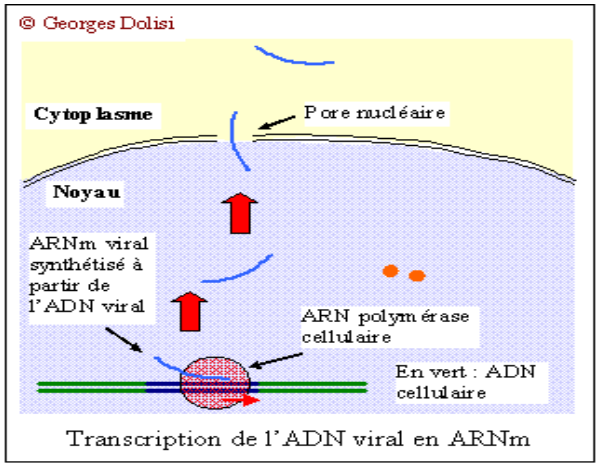


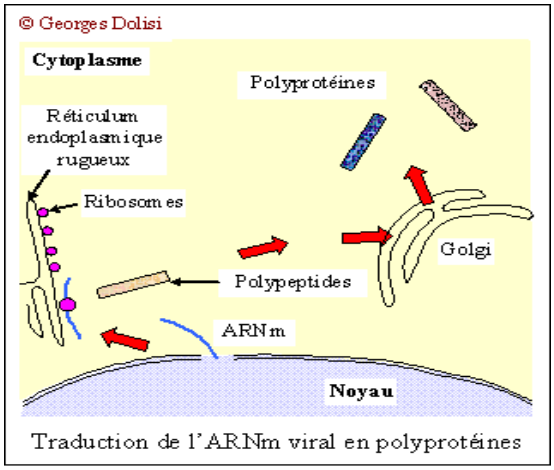
5a 5b

Figure 5 : schéma de l'entrée de l'ADN dans le noyau (5a) et de son intégration (5b)

[http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/VIH.gif] dernière mise à jour le 03/02/2016

- Transcription et traduction (figure 6) : partir du promoteur viral situé en 5' du LTR, les copies intégrées d'ADN du VIH-1 servent de matrice pour la synthèse d'ARN messagers viraux grâce à l'ARN polymérase II et les interactions coordonnées de la protéine Tat et des facteurs de la transcription





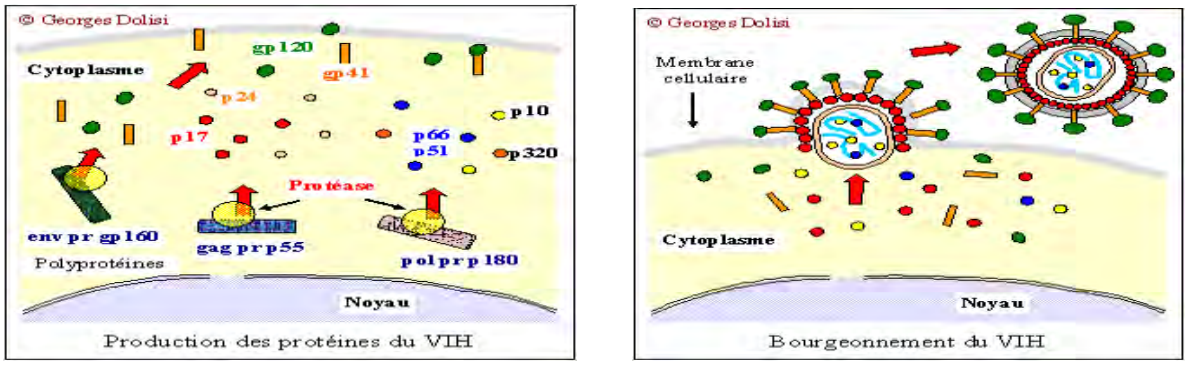
6a 6b

Figure 6 : schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral

[*http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/VIH.gif*] dernière mise à jour le 03/02/2016

- L'Assemblage et le bourgeonnement (figure 7) : Les poly-protéines Pr55Gag et Pr160Gag-Pol, en association avec les protéines accessoires (*vif, vpr, nef*) et le génome viral nouvellement synthétisé, se regroupent à la membrane puis s'assemblent avec les protéines de l'enveloppe, la gp120 et la gp41. C'est le *vpu* qui stimule la relâche des nouvelles particules virales. La protéase virale clive les précurseurs protéiques Pr55Gag

et Pr160Gag-Pol et la capside se condense puis adopte sa forme caractéristique en cône. Le virus peut alors entamer un nouveau cycle de réplication.



7a **7b**

Figure 7 : assemblage (7a) et bourgeonnement (7b) des nouveaux virions [*http://georges.dolisi.free.fr/Schemas/VIH.gif*] dernière mise à jour le 03/02/2016

5. Diagnostic biologique et suivi immuno-virologique de l'infection :

Les méthodes de dépistage de référence sont actuellement les méthodes immuno-enzymatiques de type "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA) combiné de 4e génération. La majorité des trousses détecte les IgM et IgG anti-VIH-1/2 à l'aide d'antigènes qui sont des protéines recombinantes. La détection supplémentaire de l'antigène p24 dans ces tests permet un dépistage plus précoce de quelques jours au cours de la primo-infection (environ trois semaines après la transmission du virus).

On peut également effectuer une recherche isolée de l'antigène p24 (positive en 15 jours) ou du génome viral dans le plasma (positive en 10 jours) en cas de suspicion de primo-infection. Les tests dits « rapides » sont facilement réalisables mais n'ont pas le même niveau de sensibilité que les tests ELISA combinés au cours de la phase aiguë. Ces tests font appel à une agglutination ou à une adsorption du complexe antigène-anticorps sur une membrane, suivie d'une coloration visible à l'œil nu.

De par le risque de faux positifs avec ces tests (facteurs rhumatoïdes, anticorps antinucléaires), une technique de confirmation est nécessaire en cas de positivité ou de doute. La technique de référence est le Western-Blot : des protéines virales sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose. La présence d'anticorps contre une protéine donnée est révélée par une réaction immuno-enzymatique, qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. Les critères de positivité sont ceux de l'OMS et consistent en la présence d'anticorps dirigés contre au moins deux des glycoprotéines

d’enveloppe pour le VIH-1, et d'anticorps dirigés contre au moins une glycoprotéine d'enveloppe, une protéine codée par *gag* et une protéine codée par *pol* pour le VIH-2. Un des intérêts de ce test est de soupçonner des cas de primo-infection sur la base de profils incomplets, notamment lorsqu’est observée une réactivité contre les protéines gp160 et p24.

Toute positivité sur ce premier test de discrimination doit être confirmée sur un second prélèvement de sérum pour s’affranchir d’un problème d’identité et poser définitivement le diagnostic d’infection par le VIH.

La mesure de la charge virale plasmatique (CV) par amplification génique (RT-PCR en temps réel : "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction") permet d’évaluer et de suivre la réplication du virus, en nombre de copies d’ARN viral par millilitre de plasma.

Une variation est significative si elle atteint un facteur 3 ($0.5 \log^{10}$). Il est recommandé de suivre un patient avec la même technique de CV, et si possible dans le même laboratoire.

Le deuxième paramètre clef du suivi de l’infection par le VIH est le nombre de lymphocytes T CD4+, reflet de l’état immunitaire du patient (figure 8). L’amplification de l’ADN proviral par PCR consiste à mettre en évidence le génome viral dans la cellule. La recherche de l’ADN proviral, ajoutée à la mesure de la CV plasmatique, se révèle utile pour le diagnostic de l’infection de l’enfant né de mère séropositive, pour exclure la contamination de celui-ci. Actuellement, la culture virale (sur cellules MT2, Sup T1) n’est effectuée qu’à des fins de recherche. Elle peut rester intéressante en cas de virus variants non reconnus par les techniques moléculaires.

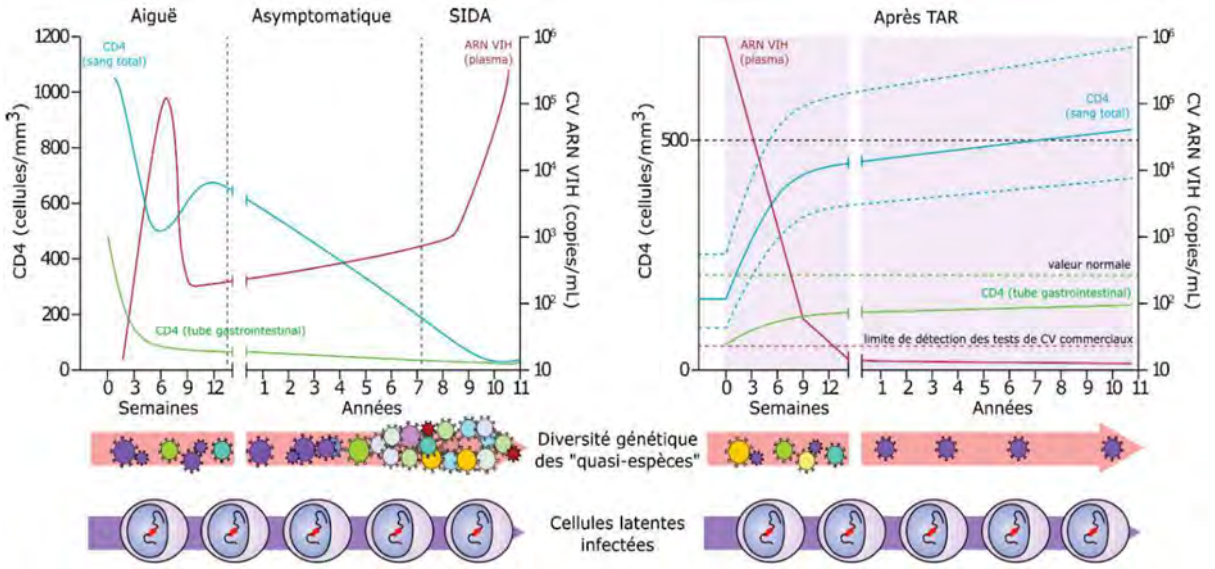


Figure 8 : évolution de la charge virale (CV) ARN du VIH et du nombre de CD4 pendant l'infection à VIH et après la mise sous traitement antirétroviral (TAR). [**Coffin and Swanstrom, 2013**]

II. DIVERSITE GENETIQUE

La répartition des différents types, groupes, sous-types et recombinants du VIH est très hétérogène à travers le monde, tant au niveau de la distribution géographique, que du nombre de personnes infectées. Le VIH-1 M, responsable de l'épidémie mondiale, est représenté par les sous-types et CRFs suivants : C (48%), A (12%), B (11%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (5%), G (5%) et D (2%) (Figure 10) (**Hemelaar et al., 2011).** Les sous-types F, H, J et K représentent <1% des infections à VIH-1 dans le monde, et les autres CRFs et URFs en représentent 4%. Au final, environ 20% des infections mondiales sont dues à des formes recombinantes circulantes et uniques (CRFs/URFs).

L'Afrique de l'Ouest et Centrale est caractérisée par une grande diversité génétique de VIH circulants. Elle est la plus élevée dans les pays du bassin du Congo où se situe l'origine des différents groupes du VIH-1 et l'émergence de l'épidémie du VIH-1 M : soit Cameroun et RDC mais aussi Angola, Gabon, Guinée Equatoriale, République du Congo (RC) et République Centrafricaine (RCA) (**Niama et al., 2006 ; Peeters et al., 2014**). Actuellement, les groupes divergents O, N et P du VIH-1 restent principalement restreints à leur pays d'origine, le Cameroun, où la prévalence est estimée à moins de 1% pour le VIH-1 O (**Villabona-Arenas et al., 2015**). Seulement une vingtaine de cas ont été décrits à ce jour pour le VIH-1 N et deux cas pour le VIH-1 P (**Delaugerre et al., 2011 ; Plantier et al., 2009**).

En Afrique de l'Ouest, CRF02_AG est majoritaire (50-80%) (**Touré Kane et al., 2000 ; Diop Ndiaye et al., 2010**) et CRF06_cpx circule aussi dans des proportions importantes (20-50%) dans certains pays (Burkina Faso, Niger, Nigeria et Togo) (**Peeters et al., 2013**). Au Sénégal le sous type C est prédominant dans le groupe des HSHs : 4% en 2000 (**Touré-Kane et al., 2000**); 7% en 2010 (**Diop-Ndiaye et al., 2010**) et 14,5% en 2013 (**Leye N. et al., 2013**).

Au Sud de l'Afrique, l'épidémie est presque exclusivement liée au sous-type C, représentant quasiment 100% des infections en Afrique du Sud, Botswana, Malawi, Mozambique, Swaziland et Zimbabwe. En Afrique de l'Est, VIH-1 C prédomine aussi au Burundi et en Ethiopie. Dans d'autres pays comme le Kenya, le Rwanda et la Tanzanie, il co-circule avec VIH-1 A et D ainsi que de nombreux URFs.

III. TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL ET RESISTANCE DU VIH AUX ARV

Le traitement des personnes contaminées (TasP: "Treatment as Prevention") constitue un moyen de réduction de la transmission efficace. Un traitement « préventif » (PrEP: "Pre Exposure Prophylaxy"), lorsqu'une personne séronégative a une conduite particulièrement à risque ou dans les couples sérodiscordants, limite également les risques de contamination.

L'objectif du traitement antirétroviral est de diminuer la morbidité et la mortalité en préservant le système immunitaire, ce qui implique la réduction de la réplication virale. En effet, nous avons vu que la destruction continue des lymphocytes T CD4+ induit l'épuisement progressif des capacités de renouvellement du système immunitaire. La suppression de cette réplication est par conséquent associée à une restauration progressive des fonctions immunitaires, évaluée en pratique par l'augmentation des lymphocytes T CD4+. Dans la cohorte COHERE, il a été montré que la mortalité des hommes ayant un taux de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500/mm^3 depuis plus de trois ans est comparable à celle des hommes de la population générale (**Lewden et al. 2007**). D'autre part, l'effet délétère de l'inflammation chronique et de l'activation immunitaire permanente sur des organes tels que le cœur, le rein, l'os et le SNC, est désormais connu. Le bénéfice sur la mortalité ou la progression clinique a ainsi été démontré chez les personnes ayant moins 500/mm^3 lymphocytes T CD4+, mais également chez les personnes ayant plus 500/mm^3 lymphocytes T CD4+ (essai Start) (**Lundgren et al. 2015**). Il est maintenant recommandé de commencer un traitement antirétroviral le plus tôt possible en France (**Morlat. 2014**).

Il est par ailleurs primordial de prévenir l'apparition de mutations de résistance en réduisant la réplication virale au maximum, afin de préserver les options thérapeutiques dans le temps.

L'OMS recommande une trithérapie contenant 2 INTIs et 1 INNTI, les IPs étant réservés aux situations d'échec thérapeutique (sauf patients infectés par le VIH-1 groupe O et enfants).

Plus d'une vingtaine d'antirétroviraux constituent actuellement l'arsenal thérapeutique dans les pays industrialisés. Ils sont de plus en plus administrés en une seule prise par jour, et avec un nombre considérablement réduit de gélules ou de comprimés, tout en étant souvent mieux tolérés et plus efficaces. La tolérance du traitement et plus largement la qualité de vie du patient sont actuellement des éléments indissociables de la prise en charge du malade.

Tableau I : Choix préférentiels pour un premier traitement antirétroviral (Actualisations 2018 du rapport Morlat 2013).

CHOIX PREFERENTIELS		
2 INTIs	**INNTI**	**Commentaires**
TDF/FTC 245/200mgX1	RPV 25mgX1	Si CV < 5log copies/mL
TDF/FTC 245/200mgX1	EFV 600mgX1	EFV CI chez la femme enceinte
ABC/3TC 600/300mgX1	EFV 600mgX1	Si CV < 5log copies/mL et HLA-B*5701 négatif EFV CI chez la femme enceinte
2 INTIs	**IP/r**	**Commentaires**
TDF/FTC 245/200mgX1	DRV/r 800/100mgX1	
ABC/3TC 600/300mgX1	ATV/r 300/100mgX1	Si CV < 5log copies/mL et HLA-B*5701 négatif
TDF/FTC 245/200mgX1	ATV/r 300/100mgX1	
2 INTIs	**INI**	**Commentaires**
TDF/FTC 245/200mgX1	DTG 50mgX1	
ABC/3TC 600/300mgX1	DTG 50mgX1	Si HLA-B*5701 négatif
TDF/FTC 245/200mgX1	EVG/c 150/150mgX1	Si clairance de la créatinine > 70mL/min
TDF/FTC 245/200mgX1	RAL 400mgX2	

https://cns.sante.fr/category/dossiers-expert (dernière mise à jour le 30 Mai 2018)

Tableau II : Différents schémas thérapeutiques utilisés dans la prise en charge d'une infection à VIH

Première ligne	Combinaisons thérapeutiques	Régimes alternatifs
Adultes	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (ou NVP) TDF + 3TC (ou FTC) + DTG TDF + 3TC (ou FTC) + EFV_{400} TDF + 3TC (ou FTC) + NVP
Femme enceinte et allaitante	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (ou NVP) TDF + 3TC + (ou FTC) + NVP
Adolescents	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (ou NVP) TDF (ou ABC) +3TC (ou FTC) + DTG TDF (ou ABC) + 3TC (ou FTC) + EFV_{400} TDF (ou ABC) + 3TC (ou FTC) + NVP
Enfants de 3 ans à moins de 10 ans	ABC + 3TC + EFV	ABC + 3TC + NVP AZT + 3TC + EFV (ou NVP) TDF + 3TC (ou FTC) + EFV (ou NVP)
Enfants de moins de 3 ans	ABC (ou AZT) + 3TC + LPV/r	ABC (ou AZT) + 3TC + NVP

Source : (http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/)

3TC : lamivudine ;
ABC : abacavir ;
ATV : atazanavir ;
TDF : ténofovir.
DRV : darunavir ;
DTG : dulutégravir ;
EFV : efavirenz ;
EVG : elvitégravir ;
FTC : emtricitabine ;
INI : inhibiteurs d'intégrase ;
IP: inhibiteurs de protéase ;
r : ritonavir comme booster ;
RAL : raltégravir ;

1. Classe et mécanismes d'action des ARV

La connaissance du cycle de réplication du VIH a permis de fournir de nombreuses cibles pour le développement d'agents antirétroviraux (figure 9). Ainsi la transcriptase inverse (TI), la protéase puis, plus récemment, la gp41 et l'intégrase, sont les cibles virales des molécules actuellement sur le marché. Les inhibiteurs de corécepteur CCR5 ont la particularité d'avoir pour cible la cellule humaine. Le premier antirétroviral utilisé en monothérapie fut la zidovudine (AZT ou ZDV, RETROVIR®), un inhibiteur nucléosidique de la TI (INTI). Puis d'autres molécules de la même classe sont apparues et ont permis, en les combinant, d'atteindre une meilleure efficacité. A partir de 1996, est né, avec l'arrivée des inhibiteurs de protéase (IP) et des inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI), le concept de trithérapie qui combine deux INTI et un IP. Ces associations appelées HAART ont montré une efficacité considérable.

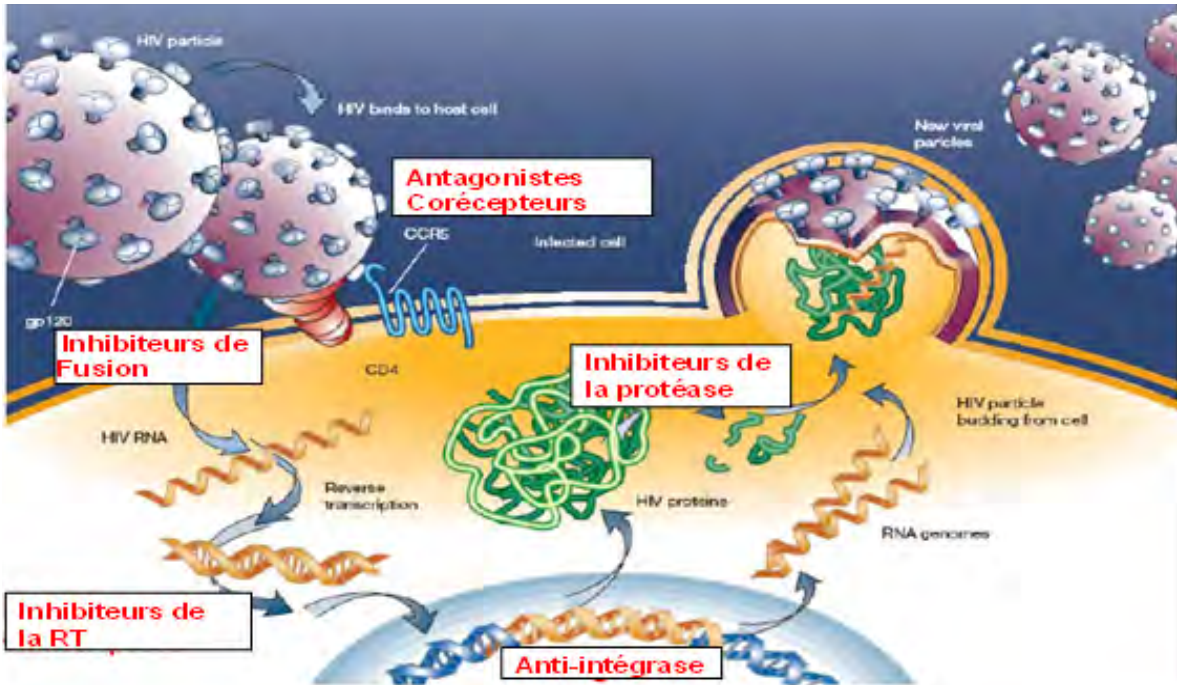


Figure 9 : cibles thérapeutique et cycle de réplication du VIH (**Weiss, 2001**)

1.1. Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

En raison de l'importance de RT dans la réplication du VIH, les inhibiteurs de cet enzyme sont des agents thérapeutiques majeurs dans la lutte contre le VIH. Les INTI sont des analogues dont la structure chimique est une version modifiée des nucléosides naturels dont ils diffèrent par l'absence du groupement hydroxyle en position 3' du désoxyribose.

Les analogues nucléosidiques triphosphorylés agissent par inhibition compétitive avec le nucléoside naturel endogène au site de fixation de la transcriptase inverse. En effet, incorporés

à l'ADN proviral préférentiellement aux nucléosides naturels de la cellule hôte, les analogues nucléosidiques en bloquent l'élongation par l'absence de groupement hydroxyle, conduisant ainsi à un ADN incomplet et non fonctionnel.

Le ténofovir difumarate (TDF, VIREAD®) a été développé à la fin des années 1990 : commercialisé en 2002. Le TDF présentel'avantage d'être déjà monophosphorylé, ce qui permet d'éviter la première étape de phosphorylation intracellulaire. Le TDF alafénamide (TAF), prodrogue du TDF bientôt disponible, pourrait avoir un impact rénal et osseux moindre que le TDF, conséquence de concentrations plasmatiques bien inférieures, pour une activité antivirale égale.

L'utilisation des INTIs a beaucoup évolué ces dernières années. Les associations à prise unique journalière dites " Single Tablet Regimen" (STR) TDF + emtricitabine (FTC) + efavirenz (EFV), TDF + FTC + elvitégravir (EVG) + cobicistat (c) et TDF + FTC + rilpivirine (RPV) ont été mises sur le marché commercialisée sous les noms respectifs d'ATRIPLA® en 2007, de STRIBILD® en 2013 et d'EVIPLERA® en 2014. En 2015, la première association triple avec le dolutégravir (DTG), un Inhibiteur d'intégrase (INI) est arrivé : il s'agit de TRIUMEQ® (abacavir/lamivudine (ABC/3TC) + DTG). La simplicité de la prise en une fois par jour permet une amélioration de l'adhérence au traitement. Les deux associations doubles les plus prescrites sont ABC/3TC (KIVEXA®) et TDF/FTC (TRUVADA®), qui ont largement été comparées. L'association ABC/3TC peut être intéressante chez un patient à risque rénal. L'association fixe AZT/3TC (COMBIVIR®, 2 prises par jour), est utilisée dans certaines situations particulières : nouveau-né de mère séropositive, recherche d'une bonne diffusion dans le LCR, femme enceinte. Sa toxicité mitochondriale est plus importante que celle de l'association TDF/FTC (**Gallant et al. 2006).** La présentation combinant AZT/3TC/ABC (TRIZIVIR®) présente une toxicité de classe cumulée et une efficacité antivirale moindre (Tableau II).

Tableau III : Caractéristiques des principales INTIs [www.vih.org/Antiretroviral dernière mise à jour Octobre 2014].

DCI	Zidovudine	Lamivudine	Abacavir	Ténofovir	Emtricitabine
Spécialités	Retrovir®	Epivir®	Ziagen®	Viread®	Emtriva®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	300 mg x 2	150mg x 2 ou 300 mg x 1	300 mg x 2 ou 600mg x1	245 mg x 1	200 mg x 1
Principaux effets secondaires	Myélotoxicité (surveillance NFS) Myopathie Nausées Acidose lactique	Myélotoxicité en association avec AZT	Réactions d'hypersensibilité (fièvre, rash, nausées, vomissements) : recherche de l'allèle HLA B*5701. Risque proche de zéro chez les non porteurs.	Toxicité rénale (surveillance fonction rénale)	Céphalées Diarrhée Nausées Elévation CK

Remarque : Traitement oral « préventif » :

La prophylaxie pré-exposition (PreP) comme moyen de prévention du VIH fait beaucoup parler d'elle. Dans l'essai iPrEx, une prise quotidienne en continu d'un comprimé de TRUVADA® (TDF/FTC) apportait une réduction de l'incidence de 44% de l'infection par le VIH chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) et à haut risque de contamination (**Grant et al. 2010**) . L'étude Ipergay («Intervention Préventive de l'Exposition aux Risques avec et pour les Gays»), réalisée en double aveugle, a évalué une stratégie de prévention de l'infection par le VIH par traitement antirétroviral « à la demande » (TDF/FTC, avant et après rapports sexuels). Évaluée face à un placebo, la PrEP prise à la demande a démontré une efficacité de 86% dans le cadre de l'essai, signifiant qu'un participant prenant la PrEP avait 7 fois moins de risque d'être infecté par le VIH qu'un participant ayant pris le placebo. Cette efficacité était directement liée à l'observance.

1.2. Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs) :

Le premier dérivé de cette famille à avoir été utilisé dans le traitement de l'infection par le VIH est la névirapine (NVP, VIRAMUNE®) en 1996. Il représente avec l'éfavirenz (EFV SUSTIVA®) les INNTIs de 1 ère génération. Ces INNTIs ont une barrière génétique particulièrement faible : les mutations de résistance apparaissent rapidement lorsque la charge virale devient détectable, même en-dessous de 200 copies/mL. Par conséquent,

cette classe d'ARV est à éviter chez tout patient peu observant ou chez lequel l'indétectabilité de la charge virale est compromise par la présence d'une résistance déjà importante. De plus, cette classe doit toujours être administrée au sein d'une trithérapie au minimum. Une seconde génération d'INNTIs est représentée par l'étravirine (ETR, INTELENCE®) et la RPV (EDURANT®). L'ETR a une barrière génétique plus élevée et est active sur certaines souches de virus résistants à la NVP ou l'EFV, mais une résistance croisée existe avec la rilpivirine. De structures chimiques très variables, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse sont des composés hautement actifs mais sur le VIH-1 seulement (**Landman et al., 2003**). Le VIH-2 est naturellement résistant aux INNTI.

A la différence des analogues nucléosidiques, leur site de liaison est une poche hydrophobe proche du site actif de la polymérase dans la sous unité P66 de la transcriptase inverse.

Les virus présentent une faible barrière génétique vis-à-vis de ces molécules, car une seule mutation au sein du site de liaison très spécifique peut entraîner une réduction majeure de la sensibilité du virus d'où l'émergence rapide de résistance limitant l'activité de ces molécules. (**Katlama et al., 2004**).

Tableau IV : Principales caractéristiques des INNTIs. [www.vih.org/Antiretroviral dernière mise à jour Octobre 2014].

DCI	Névirapine	Efavirenz	Etravirine	Rilpivirine
Spécialité	Viramune®	Sustiva®	Intélence®	Edurant®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	200 mg x 1 pendant 14 jours puis 200 mg x 2	600 mg x 1	200 mg x 2	25mg x 1
Principaux effets secondaires	Eruptions cutanées Hépato-toxicité (surveillance rapprochée des transaminases)	Signes neuropsychiques en début de traitement Eruptions cutanées Syndrome dépressif Anomalie fermeture tube neural (CI : Femme enceinte)	Cas sévères de syndrome d'hypersensibilité (Lyell, DRESS)	Effets neuropsychiatriques Eruptions cutanées Troubles digestifs Dyslipidémie

1.3. Inhibiteurs de la protéase (IPs)

L'arrivée de cette classe d'ARV en 1996 a révolutionné la prise en charge des malades. Ce sont, pour la plupart, des peptidomimétiques qui vont se lier de façon compétitive sur le site actif de la protéase. Ainsi, les IPs bloquent une phase tardive de la maturation virale.

Ces inhibiteurs empêchent l'activité de l'enzyme virale de sorte que les virus nouvellement produits sont défectueux (immatures) et incapables d'infecter de nouvelles cellules. Elles sont dotées d'une forte affinité pour le site actif de la protéase virale dont elles inhibent l'activité de façon presque totale et irréversible. Les IP sont actifs aussi bien sur les lymphocytes CD4 que sur les cellules quiescentes (macrophages). Pour potentialiser leur action, on combine à toutes les molécules antiprotéases de la Ritonanavir à faible dose : on parle alors d'antiprotéase boosté.

Tableau V : Caractéristiques des principales IPs. [www.vih.org/Antiretroviral dernière mise à jour Octobre 2014].

DCI	Ritonavir	Tipranavir	Atazanavir	Lopinavir/ r	Darunavir
Spécialité	Norvir®	Aptivus®	Reyataz®	Kaletra®	Prezista®
Posologie moyenne avec Ritonavir (adulte / 24h)	N'est plus utilisé en tant qu'antirétroviral mais en tant que « booster »	500 mg/100mg x 2	300/100 mg x 1	200/50 mg x 2/j	600/100 mg x2/j ou 800/100 mg x1/j
Principaux effets secondaires	Troubles digestifs Paresthésies péri-orales Dysgneusies Lipodystrophie Augmentation des transaminases	Toxicité hépatique Hyperlipémie Saignement Eruptions cutanées Céphalées Troubles digestifs	Lipodystrophie Troubles du système nerveux Ictère oculaire Jaunisse Troubles digestifs Rash	Troubles digestifs Eruptions cutanées Augmentation des transaminases, de l'amylase et des GGT	Dyslipidémie, Hyperglycémie Lipodystrophie Troubles digestifs

1.4. Inhibiteurs d'entrée

Deux classes agissant sur l'étape d'entrée du virus dans la cellule sont commercialisées une troisième, les inhibiteurs d'attachement, est en cours d'étude.

❖ Inhibiteur de fusion

L'enfuvirtide (T20, FUZEON®) est apparu sur le marché en 2003, c'est une petite molécule de 36 acides aminés mimant la région HR2 de la gp41 et se fixant sur la région HR1 de celle-ci. Cette liaison empêche le repliement de la gp41 et ainsi la formation du pore de fusion (**Jiang et al., 2003**).

❖ Inhibiteur de CCR5

Dans cette classe seul le maraviroc (MVC, CELSENTRI®) a été mis sur le marché et dispose d'une AMM. Son utilisation nécessite que le tropisme de virus soit vérifié au préalable ; il est inactif si le virus peut utiliser le corécepteur CXCR4 (**Saag et al. 2009**). Le MVC

se fixe sur la partie transmembranaire du corécepteur CCR5, empêchant ainsi l'entrée du virus dans la cellule. En revanche, étant métabolisé par le cytochrome P450, notamment le CYP3A4, les interactions médicamenteuses sont nombreuses.

❖ **Inhibiteur d'attachement**

Un nouvel inhibiteur d'attachement a récemment été mis au point par la firme Bristol Myers Squibb: le BMS-626529, prodrogue d'un premier inhibiteur d'attachement, le BMS-663068. Il inhibe sélectivement l'attachement du virus au récepteur CD4, en se liant à la gp120 et empêche ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le sous-type CRF01_AE et le VIH-1 du groupe O ne semblent pas sensibles à cette molécule, dont l'activité apparaît indépendante du tropisme viral (**Soulié et al. 2013**).

1.5. Inhibiteurs d'intégrase (INIs)

Le raltégravir (RAL, ISENTRESS®), premier représentant de la classe des INIs, a été commercialisé en 2007. L'elvitégravir (EVG), puis le DTG ont ensuite été développés. Ces molécules sont des inhibiteurs sélectifs de transfert de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte, et donc de l'intégration du génome viral à celui de l'hôte (étape dirigée par l'intégrase). Elles sont capables de réduire rapidement la charge virale plasmatique mais possèdent une barrière génétique variable selon les molécules. Elles sont bien tolérées.

Tableau VI : Caractéristiques des INIs. [www.vih.org/Antiretroviral dernière mise à jour Octobre 2014].

DCI	Raltégravir	Elvitégravir	Dolutégravir
Spécialité	Isentress®	Dans l'association Stribild®	Tivicay®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	400mg X2	EVG/cobicistat 150/150mg X1	50mg X1
Principaux effets secondaires	Troubles digestifs Rêves anormaux Insomnie Vertige, céphalées Augmentation des transaminases et des CPK Rash Asthénie, fatigue, fièvre	Troubles digestifs Rêves anormaux Vertige, céphalées Rash Asthénie, fatigue, fièvre	Troubles digestifs Rêves anormaux Vertige, céphalées Rash Asthénie, fatigue, fièvre

2. Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales

2.1. Définition de la notion de résistance

La résistance aux antirétroviraux est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes qui codent les cibles des ARV comme la transcriptase inverse, la protéase, la gp41 ou l'intégrase lorsque la réplication virale persiste en présence de l'antirétroviral. Les erreurs produites par la RT entraînent des mutations pouvant conférer un avantage en présence d'une pression de sélection (réponse immunitaire ou thérapeutique antirétrovirale).

La sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques (taux suboptimaux d'antirétroviral, interactions), de la puissance du traitement antiviral, et de la « barrière génétique » du virus vis à vis des différents antirétroviraux. La capacité élevée de réplique d'HIV et de ses erreurs de transcription constitue un facteur important contribuant au développement de la résistance (**Balakrishnan et al., 2006**).

- La résistance acquise ou induite (secondaire) qui survient chez des patients sous traitement.
- La résistance primaire ou transmise observée chez les sujets naïfs qui présentent d'emblée des souches résistantes.

2.2. Mécanismes de résistance et mutations associées

2.2.1. Mécanismes de résistance

2.2.1.1. Mécanismes de résistance aux INTI

Deux mécanismes différents sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs nucléosiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI).

- L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé est conférée par les mutations appelées TAMs (Thymidine Analog Mutations). Comme l'a démontré **Garcia-Lerma et al, (2004)**, elles sont sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, AZT et d4T, et comprennent les mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Cette dernière associée à la D67N entraine une forte réplication en présence de ZDV. Ces mutations favorisent l'accès de l'ATP au site de polymérisation et celui-ci réagit avec l'analogue nucléosidique en le détachant de la chaîne d'ADN viral en formation. Les TAMs sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI à des niveaux divers sauf à la 3TC.

- La diminution d'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels (par discrimination ou conflit stérique) est observée avec certaines mutations, en particulier la mutation M184V sélectionnée par la lamivudine ou 3TC et l'emtricitabine (**Perez-Bercoff et al., 2007**). Ce même mécanisme est décrit pour la mutation Q151M et son complexe (mutations A62V, V75I, F77L, F116Y), ainsi que pour les mutations L74V, K65R et K70E. Ce complexe entraîne une résistance de haut niveau à ZDV, ddI, d4T et ABC, mais également à 3TC et FTC et une réduction de la susceptibilité in vitro au TDF (**Marcelin et al., 2007, Delaugerre et al., 2008).** La mutation N348I confère une résistance croisée à deux classes d'ARV (**Soo-huey et al., 2007 ; Hachiya et al., 2008**).

Les mécanismes de résistance aux INTI peuvent être expliqués par la figure 10 ci-dessous :

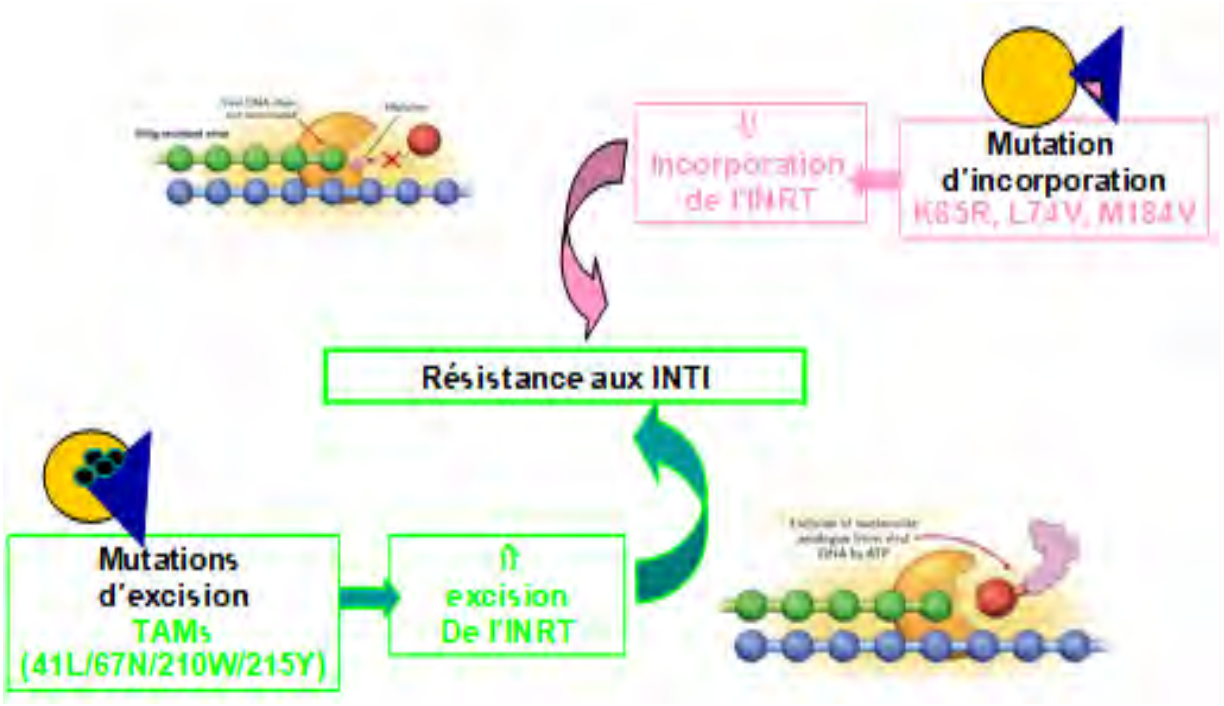


Figure 10 : Mécanismes de résistance aux INTI (**Clavel et al., 2004**)

2.2.1.2. Mécanismes de résistance aux INNTI

Les INNRT bloquent la TI en se fixant au niveau d'une poche hydrophobique étroite et proche du site actif de l'enzyme (**Yong et al., 2004**). Une seule mutation à ce niveau va entraîner une résistance de haut niveau à l'INNTI et à l'ensemble des autres molécules de cette classe. Ce sont typiquement des molécules pour lesquelles la « barrière génétique » du virus est basse puisqu'une seule mutation leur confère une résistance élevée. Il a été montré que chez un patient

échappant à un INNTI tous les composés de cette classe perdent définitivement leur activité, même si le génotype ne détecte plus de mutations aux INNTI. Ce mécanisme peut être illustré par la figure 11 suivante:

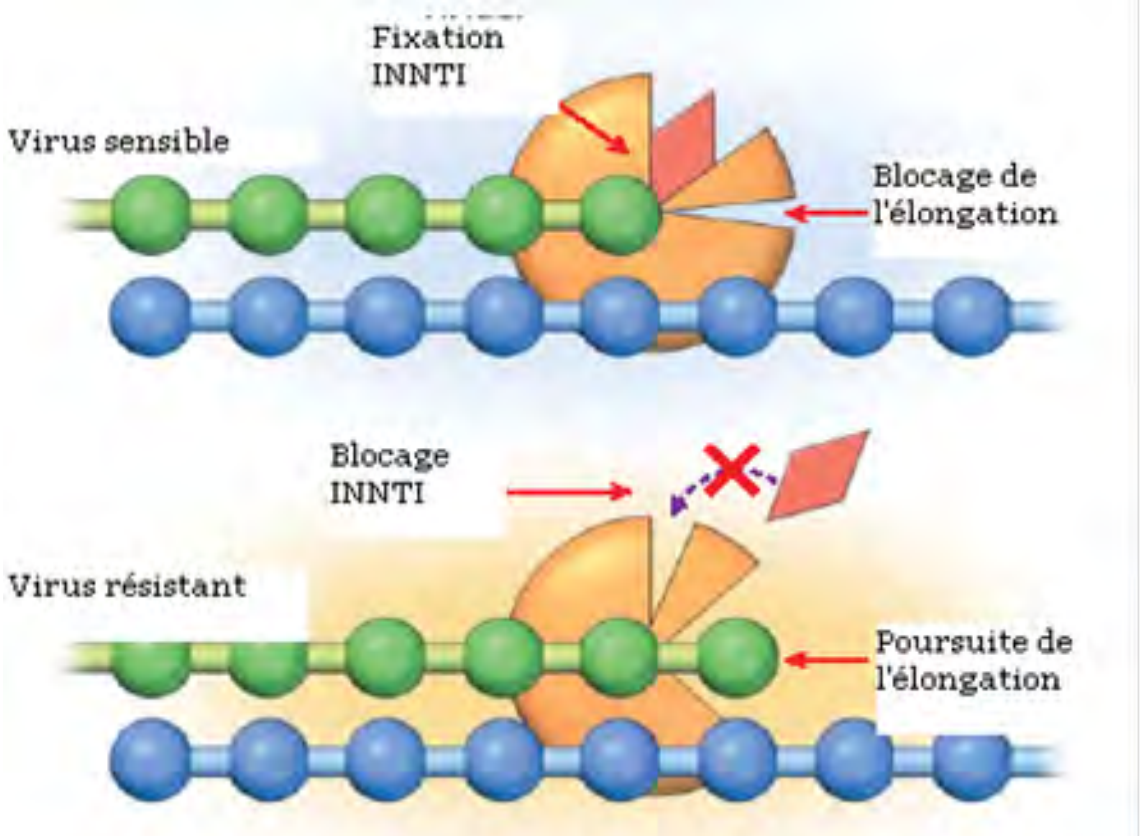


Figure 11 : mécanisme de résistance aux INNTI (**Clavel et al., 2004**).

2.2.1.3. Mécanismes de résistance aux IPs

La résistance aux IP est liée à des mutations situées au niveau du site actif de cet enzyme et à distance. Ces résistances entrainent une diminution importante de la capacité catalytique de la protéase, et une diminution de l'affinité de la liaison entre la Protéase/IP (**Martin et al., 2006**). On distingue les mutations primaires sélectionnées les premières lors d'un échappement, très souvent situées au niveau du site actif de l'enzyme et les mutations secondaires qui viendront s'accumuler pour renforcer la résistance. Certaines de ces mutations primaires sont spécifiques d'un IP ; c'est le cas de la mutation I50L sélectionnée par l'atazanavir chez des patients naïfs qui, in vitro, n'entraîne pas de résistance croisée avec les autres IP. Par contre, chez des patients ayant déjà reçu d'autres IP, d'autres mutations vont être sélectionnées par l'atazanavir, en particulier la mutation I84V responsable de résistance croisée. Les autres IP sélectionnent des mutations responsables de résistance croisée en particulier les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M qui lorsqu'elles sont associées rendent difficiles le choix d'un traitement de relais.

Parmi les nouveaux IP, le tipranavir (TPV) semble induire chez les patients prétraités des mutations sélectionnées par beaucoup d'autres IP (par exemple, V82L/T et I84V qui sont responsables de résistance croisée). Ce mécanisme peut être illustré par la figure 12 suivante :

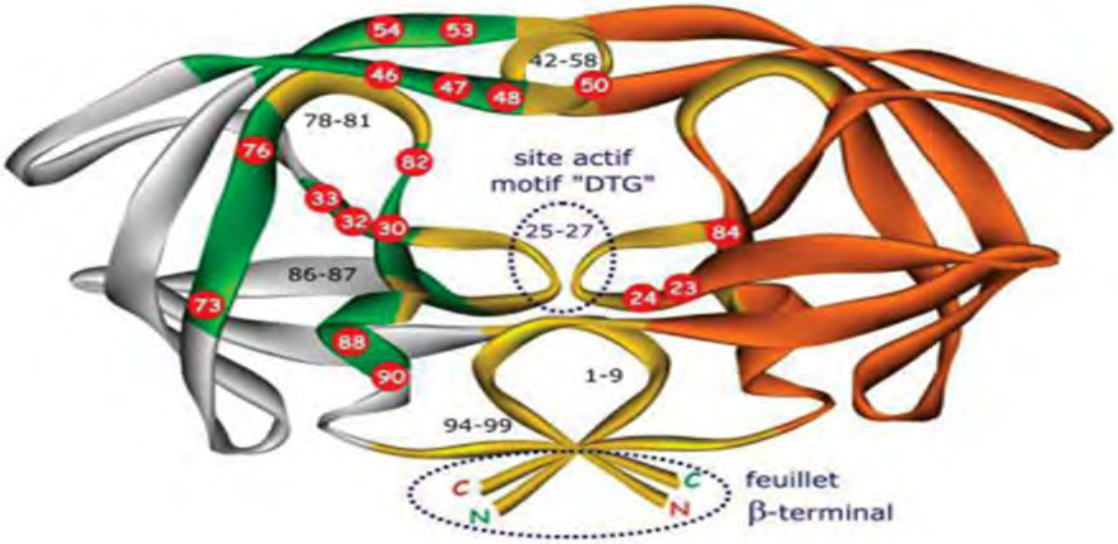


Figure 12 : Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs (**Clavel et al., 2004**).

2.2.1.4. Mécanismes de résistance aux INIs

Quatre positions principales de mutations majeures aux INIs de 1ère génération (RAL et EVG), situées à proximité du site actif de l'intégrase, ont été décrites : E92, G140, Q148 et N155 (Figure 13) (**Menéndez-Arias, 2013; Wensing et al., 2015**). Située légèrement en dehors du site actif, la position Y143 interagit aussi avec RAL.

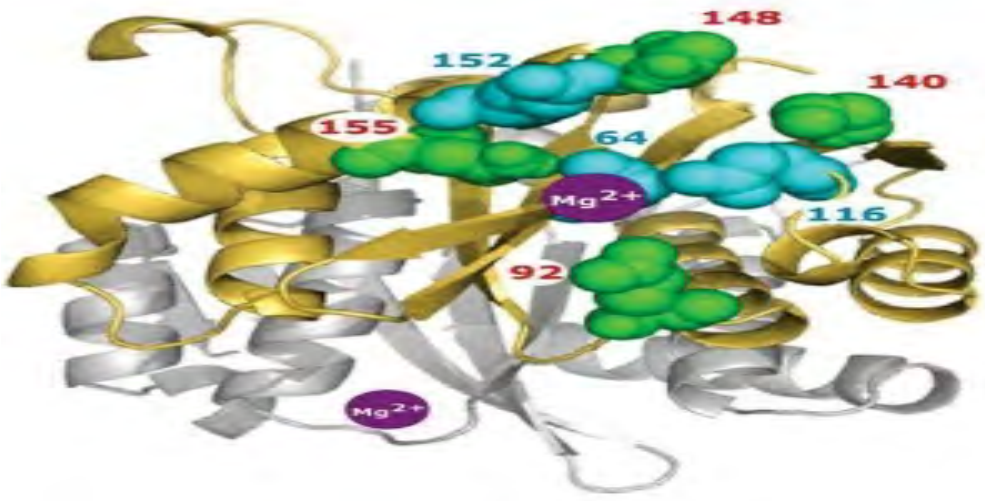


Figure 13 : Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs. (**Clavel et al., 2004**).

Le site actif de l'enzyme (acides aminés 50-212) contient notamment le motif « DDE » correspondant à Asp 64 -Asp 116 -Glu 152 (bleu) et les cations Mg2+ sont indiqués en violet. Les principales positions de mutations sont indiquées en rouge (modifié d'après Menéndez-Arias, 2013).

Il existe trois profils distincts d'acquisition de résistances avec RAL, définis par la présence d'une mutation majeure plus ou moins souvent accompagnée d'au moins une mutation accessoire : (1) « Voie Q184 » (plus fréquente) inclut Q148HKR avec souvent G140AS et/ou E138AK, ou L74M parfois ; (2) « Voie N155 » inclut N155HST, avec occasionnellement L74M, E92Q, T97A, G136R ou V151I ; (3) « Voie Y143 » (plus rare) inclut Y143CHR, avec parfois L74AI, E92Q, I203M et S230R. Certaines mutations accessoires peuvent représenter des polymorphismes génétiques chez les VIH-1 non B (**Monleau et al., 2012**).

2.2.1.5. Autres mécanismes de résistance

La résistance aux inhibiteurs de fusion est associée à des changements des acides aminés en position 36 à 45 du domaine HR1 de la gp41. Ces mutations apparaissent rapidement (quelques semaines) en cas de réplication virale sous T20. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement dans HR-2, mais ces mutations n'ont pas d'impact sur la résistance au T20 et sont probablement compensatrices des mutations de HR-1 pour la capacité réplicative. Il n'existe pas de résistance croisée entre le T20 et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs des corécepteurs CCR5.

Le mécanisme prédominant de résistance aux inhibiteurs de CCR5 semble être une émergence graduelle de mutants qui vont continuer à utiliser le CCR5 (mutations dans la boucle V3 de la gp120) (**Oswald-Richter et al., 2007**). Certains virus R5 pourraient également soit changer de tropisme et utiliser les corécepteurs CXCR4, soit devenir résistants à cette molécule par acquisition de mutations au niveau de la boucle V3 de la gp120, notamment aux positions 13 et 26.

2.2.2. Mutations associées à la résistance aux ARV

❖ Mutations associées à la résistance aux INTI

D'après l'algorithme de l'ANRS/AC11/V29 / Nov 2018

(http://www.hivfrenchresistance.org), ces mutations comprennent :

Tableau VII : Algorithme d'interprétation des tests génotypiques des résistances aux INTI [http://www.hivfrenchresistance.org] *dernière mise à jour 11/2018*

ARV	Mutations associées à la résistance	Mutations associées à une <résistance possible>
ZDV	- T215Y/F ou Q151M ou insertion 69 seule - Au moins 3 parmi : M41L, D67N, K70R, T215A/C/D/E/…K219Q/E, L210W	T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
3TC/FTC	M184V/I, insertion 69	K65R ou Q151M
ddI	- Au moins 2 parmi: M41L, T69D, L74V/I, T215Y/F, K219Q/E, K70R, M184V/I - L74V/I ou Q151M, insertion 69 seule	K65R
d4T	- V75A/M/S/T, T215Y/F, Q151M, In 69 seule - Au moins 3 parmi : M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D…, K219Q/E	T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
ABC	- Au moins 5 parmi: M41L, D67N, L74V/I, M184V/I, L210W, T215Y/F - Sans TAM et au moins 2 parmi : K65R, L74V/I, Y115F, M184V/I - Q151M ou insertion 69 seule	-4 parmi : M41L, D67N, L74V/I, T215Y/F, L210W, M184V/I -K65R
TDF	- K65R ou insertion 69 seule - Au moins 6 parmi : M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/, L210W, T215Y/F	-3, 4 ou 5 parmi : M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/, L210W, T215Y/F ou K70E à elle seule

❖ Mutations associées à la résistance aux INNTI

Les mutations de résistance aux INNTI sont représentées dans le tableau VII ci-dessous

Tableau VIII : Algorithme d'interprétation des tests de résistance aux INNTI [http://www.hivfrenchresistance.org]

ARV	Mutations associées à la résistance	Mutations associées à une <résistance possible>
EFV	-L100I, K101E, V106M, P225H, M230L, K103H/N/S/T, Y181C/I, Y188C/L, G190A/C/E/Q/S/T/V chacune à elle seule	
NVP	-A98S, L100I, K101E, V106A/M, M230L, K103H/N/S/T, Y181C/I, Y188C/H/L, G190A/C/E/Q/S/T/V seule	A98S sauf pour le sous-type C
ETV **TMC125**	-Au moins 4 parmi : V90I, A98G, L100I, K101E/P, V106I, V179D/F, Y181C/I/V, G190A/S	-3 parmi: V90I, A98G, L100I, V106I, K101E/P, V179D/F, Y181C/I/V, G190A/S

❖ Mutations associées à la résistance aux IP

Comme le montre le tableau 8 suivant, les mutations associées à la résistance aux IP sont très souvent associées pour entrainer une résistance.

Tableau IX : Algorithme d'interprétation des tests génotypiques de résistance aux IP [http://www.hivfrenchresistance.org]

ARV	Mutations associées à la résistance	Mutations associées à une <résistance possible>
IDV	-M46I/L, I84A/V, V82A/F/M/S/T seule -L90M et au moins 2 parmi : K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I	-L90M
SQV/RTV	-G48V seul -Au moins 4 parmi : L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M	-3 parmi: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M
NFV	D30N, I84A/V, N88S/D, L90M chacune seule	V82A/F/S/T et au moins 2 parmi : L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
FosAPV/RTV	-I50V seule, V32I+I47A/V -Au moins 4 parmi : L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M	
LPV/r	-Au moins 8 parmi : L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F33L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, I84V, V82A/F/S/T , L90M -I47A, L76V seule	-6 ou 7 parmi : K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F33L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M, L10F/I/R/V
ATV/RTV	-I50L -Au moins 3 parmi : G16E, L33F, M46I/L, D60E, F33L, I84V, I85V, L90M, L10F/I/V	
TPV/RTV	-Pour les sous-types B du VIH1 seulement, au moins un score de 3 : 36I/L/V, 53L/W/Y, 58E, 69I/K/N/Q/R/Y, 89I/M/R/T/V	-Pour les sous-types B du VIH1 seulement, au moins un score de 2 : 36I/L/V, 53L/W/Y, 58E, 69I/K/N/Q/R/Y, 89I/M/R/T/V
DRV/RTV	-Au moins 4 parmi : V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V	3 parmi : V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V

❖ **Mutations associées à la résistance aux autres inhibiteurs de fusion et aux inhibiteurs d'intégrase**

Les dernières classes d'inhibiteurs à voir le jour bien que n'étant pas disponibles dans la plupart des pays, présentent déjà des mutations de résistance.

Concernant l'inhibiteur d'intégrase : RAL, une parmi Q148G/K/R/E, N155H, E157Q, E92Q confère une résistance.

Les mutations conférant une résistance à l'inhibiteur de fusion la T20 sont citées sur le tableau IX ci-dessous :

Tableau X : Listes des mutations associées à une résistance à la T20 [http://www.hivfrenchresistance.org]

	Mutations associées à une résistance
ENF	• G36A/D/E/S/V [1,2,3,4,5,6,7]
T20	• V38A/E/K/M • Q40H/P/T • N42D/T • N43D/H/K/S • L44M • L45Q/M

ENF (T20) : enfuvirtide

3. Analyse et interprétation de la résistance

3.1. Généralités sur les tests de résistance

L'analyse de la résistance du VIH aux ARVs se fait généralement avec des tests génotypiques et parfois phénotypiques. L'analyse phénotypique peut être réalisée soit avec un virus isolé des cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes TCD4 et monocytes/macrophages) (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells en anglais), soit avec un virus recombinant dans lequel le gène cible (ex. pol) du patient a été inséré (Antivirogram®, Virco ; PhenoSens®, Monogram). Ces virus sont ensuite mis en culture avec différentes concentrations d'ARVs afin d'évaluer in vitro le degré d'inhibition de la réplication virale (**Hertogs et al., 1998; Kellam et Larder, 1994**). Les résultats sont exprimés par le rapport entre la CI 50 ou CI 90 (concentration inhibitrice 50% ou 90%) de la souche du patient et celle d'un isolat sensible de référence. Ces tests sont plus chers, plus complexes et plus longs à réaliser que les tests génotypiques et ils n'ont pas montré de bénéfice clinique supérieur pour la prise en charge des patients. Ils sont donc principalement utilisés pour évaluer la résistance à des nouveaux ARVs testés au cours d'essai cliniques.

L'analyse génotypique détecte les mutations de résistance en comparant les séquences de la souche du patient par rapport à celle d'une souche sensible de référence (ex. VIH-1 B HXB2 : K03455), dans les régions ciblées par les ARVs. Il s'agit généralement de l'ensemble de la protéase (codon 1 à 99) et d'une partie de la RT (codon 1-40 à 247-335) (gène pol) mais aussi en fonction du TAR, d'une partie de l'intégrase (codon 1 à 160) (gène pol) et de la gp41.

Le plasma est le prélèvement de référence pour réaliser le test génotypique afin d'amplifier l'ARN du VIH de la souche circulante chez le patient. Dans les pays du Sud le sang séché sur papier buvard (DBS, dried blood spot en anglais) est aussi utilisé. Dans les pays du Nord, ce test est parfois réalisé sur l'ADN du VIH des PBMCs lorsqu'on souhaite déterminer le sous-type viral, détecter certains polymorphismes ou mutations de résistance « archivées » (qui ne sont pas forcément celles observées chez la souche circulante) chez des patients ayant une CV ARN plasmatique indétectable. Généralement, l'ARN du VIH est extrait à partir de 140 à 500 µL de plasma. Comme l'amplification est plus difficile dans les échantillons avec de faibles CV (< 1 000 copies/mL), on peut utiliser une prise d'essai d'1 mL et réaliser une ultracentrifugation pour concentrer l'ARN du VIH-1. La région ARN ciblée est rétro-transcrit en ADNc, qui est ensuite amplifié par réaction de polymérisation en chaine (PCR, polymerase chain reaction en anglais) grâce à une Taq polymérase, en deux ou une seule étape grâce à l'utilisation d'enzymes « one-step ».

Actuellement, le principal test génotypique de résistance commercialisé est ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 (Celera Diagnostics, CA, USA), approuvé par la FDA et mis au point sur les VIH-1 B (**Eshleman et al., 2004**). Il existe aussi le kit Trugene HIV-1 Genotyping (Siemens, Healthcare, NY, USA) (**Grant et al., 2003; Jenabian et al., 2015**), qui est contraignant à utiliser car l'électrophorèse est toujours réalisée sur un gel d'acrylamide, plutôt qu'avec un séquenceur automatique. Ces tests, mis au point pour les VIH-1 B, possèdent des logiciels d'édition et d'interprétation des séquences. Avec ViroSeq, des études menées sur les variants du VIH-1 circulant dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne (Cameroun, Gabon, RCA, Sénégal et Tchad) ont rapporté des taux d'échec importants (> 10-75%) chez 4 des 7 amorces de séquençage : A et D (sens, en 5' de la protéase), F (antisens, en 3' de la protéase) et H (antisens, en 3' de la RT) (**Aghokeng et al., 2011; Mouafo et al., 2015; Thiam et al., 2013).**

Par conséquent, plusieurs tests « maison » ont été développés pour pouvoir séquençer correctement une large diversité de variants du VIH-1, dont celui du groupe AC11 de l'ANRS (www.hivfrenchresistance.org) (**Aitken et al., 2013; Inzaule et al., 2013; Manasa et al., 2014;**

Monleau et al., 2014; Zhou et al., 2011). Ces tests sont généralement moins chers (**Inzaule et al., 2016**). D'autres tests « maison » existent pour séquençer les groupes divergents N, O et P (**Villabona-Arenas et al., 2015**).

Les tests génotypiques de résistance utilisent couramment le séquençage nucléotidique classique, basé sur la méthode de Sanger, est désormais automatisé grâce à des séquenceurs (**Sanger et al., 1977**). Cette technique donne la séquence consensus issue du produit de PCR.

Les variants minoritaires ne peuvent être détectés que si leur prévalence dépasse 15 %, car en deçà les signaux de fluorescence qu'ils émettent sont masqués par ceux du produit majoritaire (**Brenner, 2014**). Principalement dédiée à la recherche, le NGS (Next Generation Sequençing, en anglais) est une technique de séquençage à haut débit qui permet de détecter tous les variants minoritaires présents dans un prélèvement. Différents appareils sont disponibles sur le marché mais ils continuent aussi d'être développés, notamment pour améliorer les longueurs de séquences générées qui sont actuellement comprises entre 75 et 400 pb. En plus de leur coût très élevé, le problème majeur de ces nouvelles technologies réside dans la quantité importante de données brutes générées, qu'il faut être capable d'en vérifier la qualité, de les analyser puis de les stocker. La présence indispensable d'un bio-informaticien pour les premières analyses, fait que la plupart des recherches produisant des séquences VIH s'effectuent sans NGS.

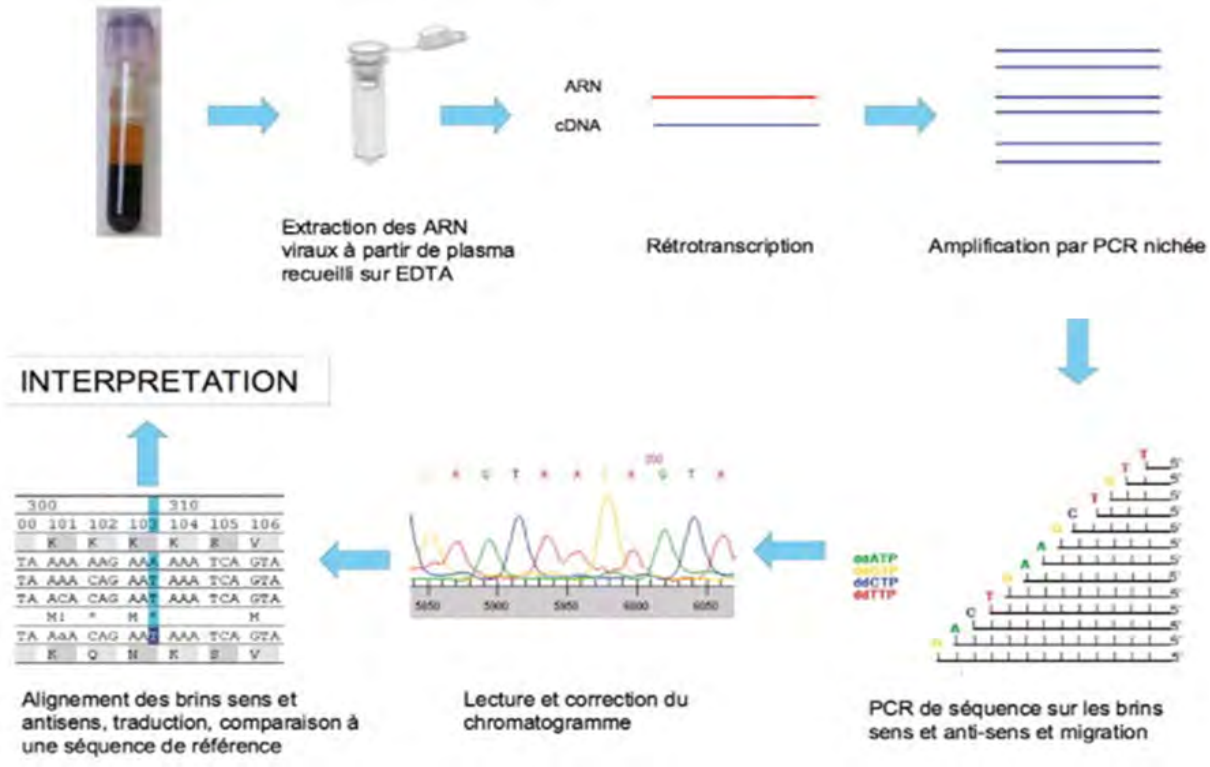


Figure 14 : Principales étapes de réalisation du génotypage de résistance (**Bigaillon et al. 2010**)

3.2. Interprétation des mutations de résistance :

L'interprétation des tests génotypiques de résistance consiste à utiliser des algorithmes qui permettent de donner un sens clinique en prédisant le succès ou l'échec thérapeutique. Les algorithmes comparent la séquence obtenue à celle d'un virus de référence sensible.

L'identification des mutations de résistance est notamment basée sur les critères suivants : (1) les mutations in vitro, qui ont été sélectionnées au cours de mises en cultures répétées en présence d'ARV et dont l'introduction par mutagénèse dirigées dans une souche de référence confirme l'impact phénotypique, (2) les mutations in vivo observées à partir des données cliniques issues des essais thérapeutiques. Il existe trois algorithmes principaux pour interpréter les mutations de résistance d'une séquence du VIH-1 en niveau de résistance aux ARVs : (1) **ANRS**, (2) **Stanford HIVdb** et (3) **Rega Institute**. Ces algorithmes sont enregistrés dans des logiciels disponibles en ligne gratuitement auxquels on soumet les séquences à analyser : http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput.

Concernant l'interprétation de séquences de VIH-2, l'utilisation de l'algorithme GRADE (Genotypic Resistance-algorithm DEutschland, en anglais) est plus adapté : http://www.hiv-grade.de/cms/grade/homepage/ (**Charpentier et al., 2015**).

Pour chaque molécule ARV, le résultat obtenu avec l'algorithme ANRS s'exprime en trois « niveaux de résistance » : Résistance (R), résistance Intermédiaire (I) et Sensible (S) ; en fonction des types ou associations de mutations observées. L'algorithme de Stanford ajoute deux niveaux intermédiaires supplémentaires (peu sensible et résistance faible). Il calcule un score total (0-60) à partir des différents scores attribués à chaque type de mutation, et en tenant compte aussi des associations de mutations possibles. Ainsi, les différences entre les algorithmes et les niveaux d'interprétation peuvent parfois conduire à des discordances de résultats sur certaines mutations de résistance, notamment chez les VIH-1 non B (**Wagner et al., 2015**). Régulièrement, les algorithmes sont mis à jour et proposent des nouvelles versions qui tiennent compte de l'évolution des connaissances.

Enfin, le Score Génotypique de Sensibilité (GSS) est parfois utilisé afin de simplifier l'interprétation des mutations. Il permet de représenter la somme des médicaments actifs présents dans un schéma thérapeutique, variant généralement entre 0 (aucun médicament actif) et 3 (**Fofana et al., 2014; Jiamsakul et al., 2014**).

En pratique, l'interprétation d'un test génotypique de résistance est à prendre avec précaution. Il faut d'abord s'assurer que le prélèvement ait bien été réalisé en présence d'un

TAR optimal. Sinon, la ré-émergence de la souche sauvage sensible (phénomène de « re-sensibiliation ») peut conduire à une interprétation erronée du résultat. En cas d'interruption de TAR, le choix des nouveaux ARVs doit donc plutôt se baser sur un test génotypique de résistance réalisé au préalable. En cas de suivi virologique régulier, il est nécessaire de ré-interpréter les anciens tests de résistance avec la version actuelle de l'algorithme utilisé afin de pouvoir les comparer correctement au nouveau test. Compte-tenu de l'archivage des mutations, il est nécessaire d'interpréter les tests de résistance de façon cumulative. Enfin, pour une interprétation complète, le résultat du test de résistance doit être accompagné de l'identification du sous-type viral par analyse phylogénétique de la séquence de la RT.

DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE

I. METHODOLOGIE

1.1. Cadre, population de l'étude et critères de sélection des participants

1.1.1. Cadre de l'étude

Notre étude a pour cadre le LBV (Laboratoire de Bactériologie Virologie) de l'Hôpital Aristide Le Dantec et la plateforme de Biologie moléculaire de l'IRESSEF (Institut de Recherche en Santé de Surveillance Epidémiologique et de Formation). Ces deux entités ont centralisé l'ensemble des échantillons parvenus des sites de l'étude à savoir le Centre de Santé Dominique de Pikine, la DLSI (Division de Lutte contre le SIDA) Dakar, l'hôpital régional de Thiès et l'EPS de Mbour. Les tests de dépistage ont été effectués sur site de recrutement et les tests virologique au LBV et à l'IRESSEF.

1.1.2. Population d'étude

Ce travail entre dans le cadre du projet Prévention du VIH 2.0 (HP2). Il s'est déroulé dans les régions de Dakar et de Thiès et avait comme cible les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH) recrutés par la méthode RDS (Respondent driven sampling). Il s'agissait d'une étude prospective avec une phase RDS pour laquelle le recrutement a duré 7mois. La méthode RDS s'inspire de la méthode boule de neige mais permet une meilleure représentativité des individus cachés et une plus grande diversité.

Par rapport aux critères de sélection des participants

Critères d'inclusion

- Né de sexe masculin
- Âgé d'au moins 18 ans
- Affirme avoir eu des rapports sexuels anaux (actifs ou passifs) avec un homme au moins une fois au cours des 12 dernier mois (Quantitatif)
- Affirme être un homme qui a des rapports sexuels avec d'autres hommes (Qualitatif)
- Habite dans la ville ou la région de l'étude depuis au moins 3 mois
- Est mentalement sain et capable de fournir un consentement à participer
- Se présente au site avec un coupon valide (sauf les graines)
- Parle français, wolof ou les deux
- Donne son consentement pour participer à l'étude

Critères d'exclusion

- Participant VIH 2
- A déjà participé au volet quantitatif de l'étude
- Désistement volontaire exprimé par le participant

1.2. Prélèvements et Conservation

Une fois les consentements obtenus, les prélèvements de sang veineux se faisaient sur site où la sérologie du VIH a été effectuée. Les restes de prélèvement ont été séparé et les aliquots de plasma conservés à -20°C. Un code d'anonymat a été attribué à chaque prélèvement de façon à ne pas reconnaitre l'identité du participant.

L'envoi des aliquots de plasma se faisait au plus dans les 72h vers l'unité de Biologie moléculaire de LBV où ces échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur manipulation.

Les tests à effectuer étaient la quantification de la charge virale ARN plasmatique et le génotypage de résistance.

1.3. Taille des échantillons

Le calcul de la taille de l'échantillon nécessaire pour la phase RDS se base sur l'hypothèse qu'il existe une prévalence du VIH de 15% chez les deux populations dans les villes concernées par l'étude, que l'effet du plan soit égale à 2 et que l'écart-type ne dépasse pas 0,030. La formule utilisée est la suivante :

$$n = deff\,\frac{PA(1-P_A)}{(se(P_A))^2}$$

n = taille de l'échantillon
deff = effet du plan
PA = prévalence anticipée

A partir de ces hypothèses, nous estimons qu'il nous faudra au moins 284 participants, ce qui a été arrondi à 300 HSH répartis dans les trois villes. Cette taille est suffisante pour l'estimation de la prévalence du VIH chez cette population. Cependant, afin de prendre en compte les participants qui vont refuser de s'inscrire dans la cohorte, il faudra dépasser cette estimation. Si on estime un taux d'inscription de 90% des invités (10% de refus) ainsi que l'exclusion de 17% des PVVIH qui connaissaient déjà leur statut sérologique, il faut recruter un minimum de 80/((1-0,1)*(1-0,17)) = 107,09505 personnes séropositive, ce que a été arrondi à 108. Cela implique le recrutement d'au moins 108/0,15 = 720 participants pour la phase RDS. Finalement 724 HSH ont été recrutés par RDS pour cette étude.

1.4. Analyses au laboratoire

1.4.1. Quantification de l'ARN viral du VIH

A partir du plasma, la quantité de virus dans le plasma est déterminée par l'appareil Abbott RealTime (m2000). Il y'a d'abord une préparation des échantillons qui a pour objectifs d'extraire et d'isoler les molécules d'ARN cibles, afin de rendre les cibles accessibles pour l'amplification et d'éliminer tout inhibiteur potentiel de l'amplification. Le dosage Abbott

RealTime HIV-1 utilise la RT-PCR (reverse transcription puis réaction en chaine par polymérisation) afin de générer un produit amplifié du génome ARN du VIH-1. Une séquence d'ARN non liée à la séquence cible du VIH-1 est introduite dans chaque échantillon au début de la préparation des échantillons. Cette séquence d'ARN non liée est simultanément amplifiée par RT-PCR et sert de contrôle interne (IC). La quantité de séquences cibles de VIH-1 présente à chaque cycle d'amplification est mesurée à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence sur l'appareil Abbott m2000. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le m2000 est proportionnel au log de la concentration d'ARN VIH-1 présente dans l'échantillon d'origine.

1.4.2. Tests génotypiques de résistance

Les tests de résistance ont été effectués chez les HSH ayant une charge virale supérieure à 3log copies/ml (>1000 copies/ml). Ces tests ont été réalisés au LBV pour la majorité des échantillons et pour le reste à l'IRESSEF.

Le génotypage de résistance a été effectué en utilisant le protocole de l'ANRS AC11 (http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf). Ce protocole comprend plusieurs étapes:

1.4.2.1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction se fait à partir du plasma. Le kit utilisé est « QIamp viral RNA » (QIAGEN®). Le principe repose sur une concentration du plasma par une brève centrifugation à 8000 rpm, une lyse de la membrane virale par un tampon AVL+ carrier pour la libération de l'ARN. Il y'a ensuite une précipitation avec de l'éthanol absolu puis un lavage sur colonne par les tampons AW1 et AW2 fournis par le kit et en fin, il y'a une chromatographie d'élution. Ainsi l'ARN est prêt à être amplifié ou gardé à -80°C jusqu'à utilisation.

1.4.2.2. Amplification de l'ADN viral

Il s'agit d'une technique "maison" consistant à réaliser deux amplifications séparées des gènes de la protéase (PR) et des 300 premiers acides aminés de la transcriptase inverse (TI) du VIH-1. La RT-PCR ANRS consiste à faire en un temps, la rétrotranscription et l'amplification génique d'un fragment de 792 pb du gène codant la RT et d'un fragment de 562 pb codant la protéase. Pour cette méthode, les amorces externes sont MJ3, MJ4 pour la RT et 3'prot1, 5'prot1 pour la protéase. Les amorces internes sont pour la RT

- MJ3 (5'AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') sens
- MJ4 (5' CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T 3') anti-sens
- 3'PROT1 (5' TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC T 3') sens
- 5'PROT1 (5' GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG 3') anti-sens
- Les amorces internes sont pour la RT A (35), NE1(35) et pour la protéase on a la 3'prot2 et 5'prot2.
- A (35) (5' TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') sens
- NE1 (35) (5' CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT 3') anti-sens
- 3'PROT2 (5' TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A 3') sens
- 5'PROT2 (5' AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC 3') anti-sens.

Le produit obtenu est révélé sur un gel d'agarose 1%, préparé à partir du TBE (mélange de Tris, Acide borique et EDTA dans de l'eau distillée) et du bromure d'éthydium (BET) qui confère à l'ADN une fluorescence sous UV. Cette vérification consiste à déposer 5µl du produit dans le gel, de faire migrer à 100 volt pendant 15 à 20 mn, de révéler et de photographier avec l'aide d'UV les bandes d'ADN marquée d'une étiquette fluorescente par le BET. Un exemple de photographie de résultat de PCR peut être illustré par la figure 15 suivante.

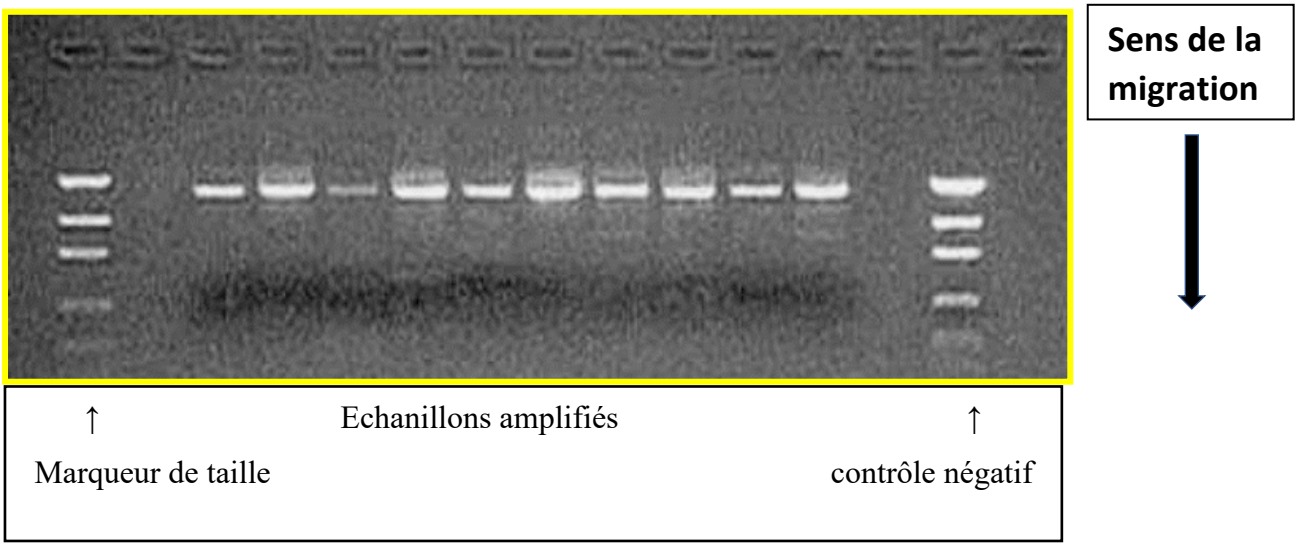


Figure 15 : Exemple de vérification du produit de PCR de fragment de la RT

1.4.2.3. Purification

Pour éliminer les bandes d'ADN parasites et les surplus des réactifs, le produit de PCR est purifié. L'enzyme « PCR clean up » est utilisé pour la purification enzymatique et le kit « Invitrogen », pour la purification sur gel.

Ce dernier consiste à:

- Faire migrer la totalité du produit de PCR dans un gel d'agarose à 1% d'abord,
- De découper les bandes cibles en se référant au marqueur.
- De laver et récupérer le produit par élution.

Après la purification, l'ADN est quantifié afin de déterminer la quantité nécessaire pour obtenir une bonne séquence. Cela consiste à déposer 1µl d'ADN dans un gel d'agarose et de faire migrer à 100 volts pendant 15 à 20 mn en présence toujours d'un marqueur de taille.
Les produits de PCR purifiés font par la suite l'objet d'un séquençage direct utilisant les amorces de 2iéme round de la PCR (voir annexe 1). Pour chaque échantillon, les séquences des deux gènes sont assemblées puis éditées à l'aide du logiciel Seqman de la suite DNAStar afin de générer une séquence consensus constituée d'un fragment unique PR-RT.

1.4.2.4. Analyse des données de séquençage

1.4.2.4.1. Principe du séquençage

La réaction de séquence consiste à mettre dans un tube une seule de ces amorces:
A (20) et NE1 (20) pour la RT, 5'Prot2 et 3'Prot2 pour la protéase ; l'ADN purifié, le Mixe Big Dye Terminator (constitué par la Taq polymérase, les dNTPs et les ddNTPs), H_2O distillée, un tampon de dilution. Elle se fait en 3 grandes étapes répétées entre 25 et 30 cycles dans un thermocycleur :

- Une dénaturation à 94°C pendant laquelle les deux brins d'ADN sont séparés.
- Une hybridation à 55°C où les amorces se fixent aux extrémités des brins d'ADN.
- Une extension à 60°C où la Taq polymérase copie des brins complémentaires. Du faite de la présence de ddNTPs marqués, la température d'extension est abaissée comparée à une PCR. Ainsi à chaque fois qu'un ddNTP est intégré, l'élongation s'arrête.

Les ddNTPs en excès pouvant interférer dans la détection, sont éliminés par précipitation grâce à de l'éthanol absolu et de l'acétate de sodium à pH 5,2.
Apres la précipitation, le produit est récupéré dans de la formamide et déposé dans la plaque du séquenceur. Il est prélevé par les pipettes d'injection et migre par électrophorèse dans un gel : 3100 Avent POP6 polymer à travers les capillaires, le ddNTP conférant une étiquette fluorescente.

Un laser excite les ddNTP marqués et envoie la lumière de couleurs distinctes. Cette lumière est collectée et focalisée à travers les lentilles d'un spectrographe. Elle est ensuite séparée à travers une caméra CCD en fonction de la longueur d'onde.

Chaque base a sa propre couleur : l'adénine en vert (**A**), la guanine en noir (**G**), la cytosine en bleu (**C**) et la thymine en rouge (**T**).

Les chromatogrammes et l'analyse des mutations ont été sauvegardés pour chaque échantillons.

1.4.2.4.2. Correction et analyse des séquences

Les séquences obtenues sont corrigées à travers le logiciel Seqman afin d'éliminer les erreurs de détection. Elles sont ensuite soumises sur le site de Stanford et les résultats sont comparés avec d'autres algorithmes tels que ANRS, REGA pour l'analyse et l'interprétation des mutations de résistances aux ARV.

1.4.2.4.3. Alignement des séquences et la phylogénie

Pour comparer deux ou plusieurs séquences, il est nécessaire de les aligner. Il y'a plusieurs programmes disponibles sur l'internet, pour l'alignement de séquences. Celles-ci sont toutes fondées sur des modèles mathématiques différents afin de comparer deux ou plusieurs séquences avec la plus optimale. L'alignement aura une incidence sur les distances entre les 2 espèces différentes, ce qui influencera la phylogénie.

Pour cette étude l'alignement des séquences et la phylogénie ont été réalisés à l'aide du logiciel Seaview v4.6.1 (Galtier et al. 1996 ; Gouy et al. 2010).

L'analyse de recombinaison a été réalisé à l'aide du logiciel Simplot v3.5.1 (Lole et al. 1999).

1.4.3. Analyses statistiques des données

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel. Les analyses ont été effectuées à l'aide de Excel v3.3.1.

II. RÉSULTATS

1. Caractéristiques démographiques de la population d'étude

Durant la période du 08 Avril 2015 au 20 Novembre 2015 s'est déroulé la phase RDS de l'étude HP2 V2.0 intégrant 724 participants issus de différents sites notamment les villes de Dakar, Mbour et Thiés (voir tableau XI).

La tranche d'âge la plus représentée était de 18 à 24ans soit 62,70%.

La sérologie rétrovirale a été réalisée sur les sites de recrutement en utilisant l'algorithme en vigueur avec l'utilisation du test Determine HIV en screening (première intention) et ImmunoComb II HIV-1&2 BiSpot pour la confirmation et la discrimination.

Tableau XI : Description générale de la population d'étude

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentage (%)
SITE		
Dakar	462	63,81
Mbour	159	21,96
Thiés	103	14,23
VIH		
Positif	217	30
Négatif	507	70
Age		
<25 ans	454	62,71
25 – 34 ans	214	29,56
> 35 ans	56	7,73

La prévalence du VIH est estimée à 30% dans cette population de HSHs avec une majorité retrouvée dans la ville de Dakar (tableau XII). Il faudra noter que 1,5% des participants séropositifs étaient doublement infectés par le VIH-1 et le VIH-2 alors que 0,4% étaient positifs au VIH-2.

Tableau XII : Répartition des participants selon leur statut sérologique

Sites	Effectif	VIH positifs	Profil sérologique VIH	Prévalence VIH
Dakar	N=462	N=151	VIH-1: N=142 VIH-2: N=02 (0,4%) VIH-1+VIH-2: N=07 (1,5%)	32,70%
Mbour	N=159	N= 38	VIH-1: N=35 VIH-1+VIH-2: N=03 (1,8%)	23,90%
Thiès	N=103	N= 28	VIH-1: N=26 VIH-2: N=01 (0,97%) VIH-1+VIH-2: N=01 (0,97%)	27,20%
Total	N=724	N=217	VIH-1: N=203 VIH-2: N=03 (0,4%) VIH-1+VIH-2: N=11 (1,5%)	30%

Parmi les 217 participants séropositifs 37 participants avaient déclaré avoir déjà connu leur statut sérologique VIH parmi lesquels seulement 30 ont déclaré avoir déjà étaient mis sous traitement.

2. La charge virale

La figure ci-dessous résume les effectifs et les valeurs de charge virale obtenus.

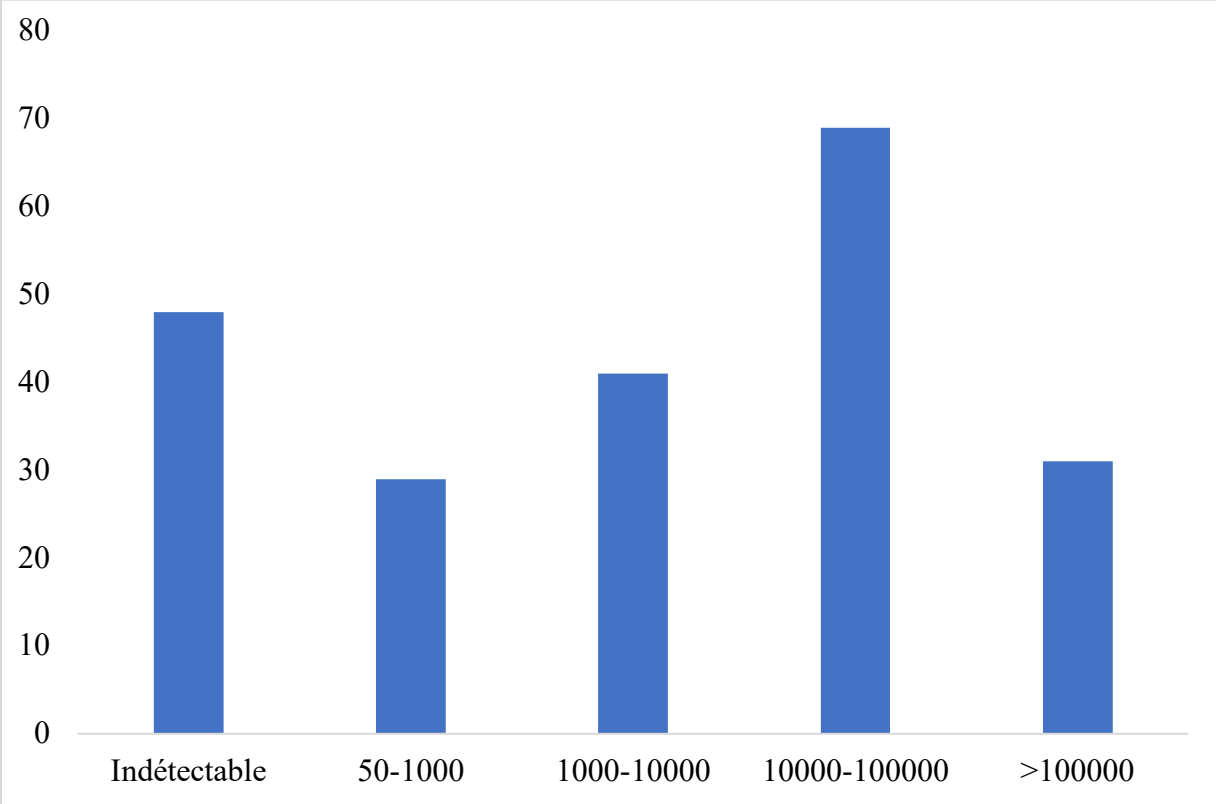


Figure 16 : Répartition des patients en fonction de la charge virale ARN VIH plasmatique

Parmi les 217 participants séropositifs au VIH, les 216 ont disposés de la charge virale ARN VIH plasmatique dont 140 participants avaient une CV supérieure ou égale à 1000cp/ml soit 64,5%.

Environ 22% étaient à une valeur de CV indétectable c'est à dire inférieure à 50 copies/ml.

Les charges virales détectables supérieures à 1000 copies/ml ont été génotypés pour la recherche des mutations conférant une résistance aux molécules antirétrovirales et d'étudier la diversité génétique.

3. Génotypage de résistance

- **Taux d'amplification réussi**

Sur les 140 échantillons de participants qui avaient une CV ARN VIH plasmatique supérieure ou égale à 1000 cp/mL (3log10), un total de 92 échantillons ont pu être amplifiés et séquencés au niveau du gène codant pour la reverse transcriptase et la protéase soit un taux d'amplification réussi de 65,71%.

❖ Caractérisation moléculaire des souches rencontrées

L'analyse phylogénétique (figure 17) montre une prédominance des souches CRF02_AG (43/92 soit 46,74%) et C (42/92 soit 45,65%). Elle montre aussi la présence d'autre variants tels que les sous-types B, le CRF06_cpx et CRF09_cpx

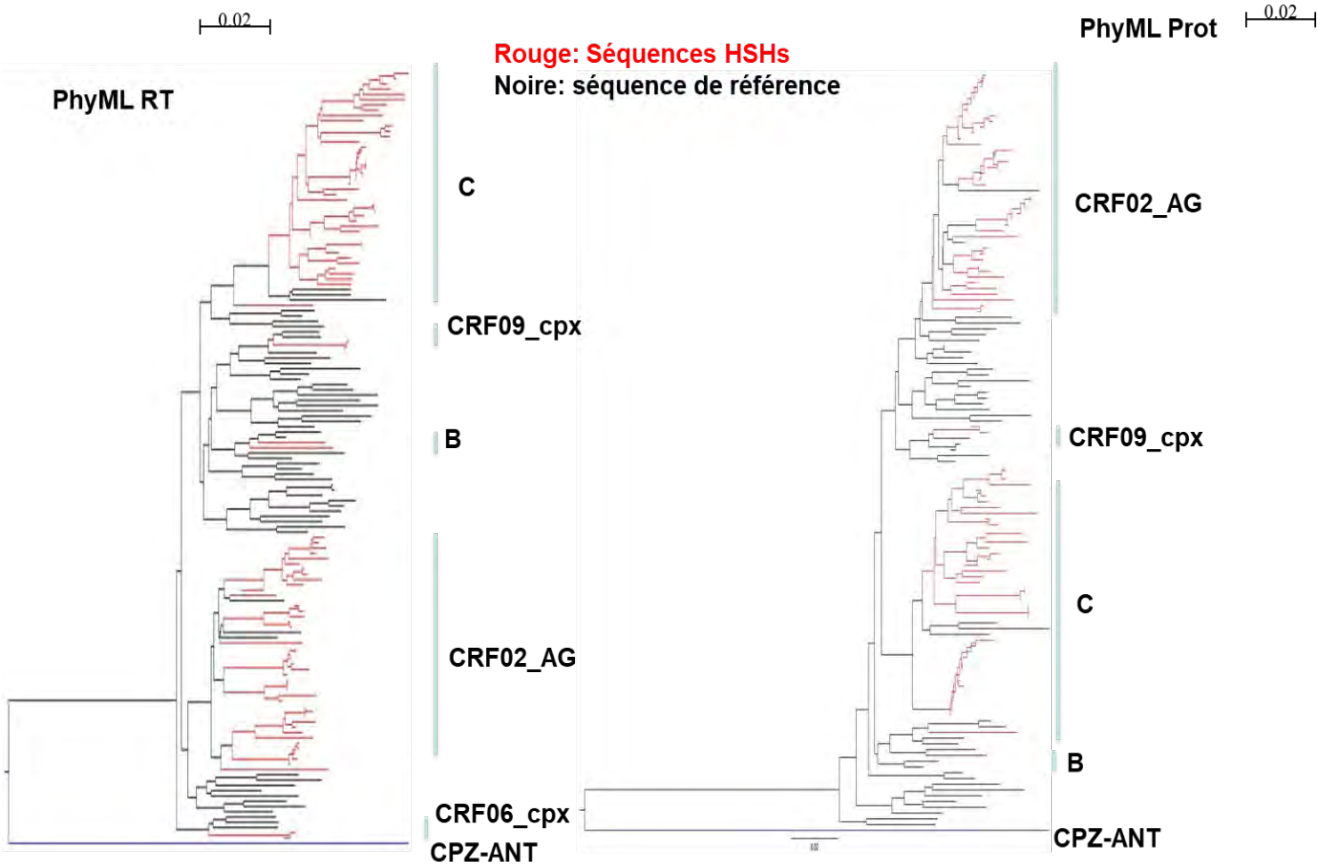


Figure 17 : Arbre phylogénétique des souches au niveau de la RT et de la PROT

❖ Les mutations de résistance rencontrées

Sur les 92 séquences obtenues sur le gène de la RT:

- 62 étaient naïfs de tout traitement antirétroviral (TAR)
- 30 participants avaient déclaré avoir déjà reçu un traitement ARV

On a retrouvé 10 participants parmi les 62 participants naïfs de TAR ayant au moins une DRM, soit un taux de résistance primaire de 16,1%.

Cependant 06 parmi les 30 participants qui avaient déjà reçu un traitement ARV, présentaient au moins une DRM soit un taux de résistance secondaire de 20%.

La distinction de la résistance primaire par classe d'ARV nous a permis de déterminer le pourcentage de mutations de résistance suivant :

- Mutations portant sur les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :
- La mutation **T215S/Y** était la plus représentée soit 4,8% (n=3/62) La mutation **M184V** est également retrouvée.
- Mutations portant sur les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) sont estimés à 12,9% (n=8/62) avec majoritairement la mutation K103N (21,21%). On y retrouve également les mutations V106M, V179E/T, V108I, A98G…
- Par ailleurs, aucune mutation de résistance n'a été trouvée sur le gène de la protéase.

III. DISCUSSION

Du 08 Avril au 20 Novembre 2015, nous avons réalisé une étude transversale portant sur l'évaluation de la résistance aux ARV chez les HSH et l'état des lieux de la prévalence du VIH dans cette population particulière. Pour cela avons enrôlé 724 participants issus de différents sites géographiques par la méthode RDS. Un des points forts de notre étude est le mode de recrutement des participants, qui a été utilisé : Respondent driven sampling. Il est fortement recommandé de procéder au choix aléatoire des participants, afin de s'offrir la chance d'atteindre une large frange de la population de l'étude. Cependant, notre méthode d'échantillonnage était basée sur le volontariat. Les HSH sensibilisés par leurs pairs (graines), devraient se rendre volontairement sur le site de l'enquête munis de leur coupon. Toutefois notre méthode basée sur la référence par des pairs est reconnue efficace pour la réalisation des études de surveillance comportementale et biologique du VIH au sein des groupes à haut risque et difficile à atteindre par les méthodes classiques (**Longo Jean De Dieu, 2016**)

Les limites et difficultés liées à la réalisation de cette étude ont été entre autres le délai de recrutement des patients relativement long (initialement prévu sur 4mois) qui a dû être prolongé pour atteindre un effectif d'échantillons adéquat par rapport à la taille des échantillons initialement définie, les perdus de vue ainsi que les doublons qui ont rendu impératif l'assainissement des données collectées avant analyse. Toutefois les résultats obtenus à l'issue des travaux nous ont permis de faire le point de la prévalence du VIH et de la résistance du VIH aux ARV chez les Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes (HSHs).

1. Population d'étude

Les caractéristiques de notre population d'étude ont été les suivants, l'âge moyen était de 45ans avec les extrêmes de 18 et 72 ans. Le taux de séropositivité VIH était de 30%. Cette forte prévalence corrobore avec celle trouvée dans la littérature pour les HSHs. Le rapport ONUSIDA 2015 sur les populations clés hautement exposées au risque VIH en Afrique de l'Ouest et du Centre estime une variation de la prévalence du VIH chez les HSH de 6 à 37% dans ces régions de l'Afrique. Le rapport du CNLS 2017 du Sénégal a noté une prévalence qui est passé de 21,8% en 2007 (**ELIHoS 2007**) ce qui montre la gravité de la problématique du VIH dans ce groupe à risque où la prévalence continue à augmenter une décennie après.

Cependant on note que les cibles sont de plus en plus jeunes, nous avons retrouvé une forte association entre l'âge et l'infection à VIH ($p<0,001$). La prévalence, dont le taux augmentait avec l'âge, touchait durement les tranches d'âge de 18 à 24 ans dans une proportion de

(62,70%). Nos résultats différent avec ceux de Billong et al., qui ont observé que les HSH âgés de 25 ans ou plus étaient beaucoup plus infectés (68%) (**Billong SC, 2013**)

Cela suggère que les gens jeunes s'identifient très tôt à ce groupe d'individus et s'exposent d'avantage au risque VIH ce qui très important par rapport à la cible sur laquelle les interventions devront être axer. En effet le rapport du CNLS 2017 a montré que chez les HSHs ayant entre 18 à 19ans on retrouve une augmentation de la prévalence du VIH de 3fois et ½ soit 19,9%. (**Rapport CNLS 2015**)

2. La charge virale

Nous avons réalisé la charge virale ARN VIH plasmatique chez tous les participants à l'aide du kit Generic HIV (Abott Real Time HIV-1) et le kit NucliSENS EasyQ s'il s'agit de HIV-2. La médiane était de 90 656 copies/ml avec des extrémités de 40 copies/ml et 1630000 copies/ml. Ces résultats concordent avec le fait que seulement 13,2% des participants séropositifs au VIH connaissaient leur statut et 82,8% de ces individus sont naïfs de tout traitement antirétroviral ce qui justifie les valeurs élevées des charges virales obtenues.

3. Génotypage de résistance

Nous avons utilisé la technique de l'ANRS AC11 pour le génotypage de résistance des 140 échantillons qui avaient une charge virale ARN plasmatique supérieure ou égale à 1000copies/ml. Quatre-vingt-douze (92) échantillons ont pu être amplifiés et séquencés au niveau de la région Pol soit un taux d'amplification réussi de 65,71%. Ce taux reste inférieur à celui présenté par d'autres auteurs. **Bangoura et al 2015**, ont trouvé un taux de 84,4%, idem en Tanzanie (94%), et au Sénégal 81,88% (**Diouara et al. 2014**) et 75% dans l'étude de **Kaba D. 2016.**

L'analyse des données de CV montre que 41 patients avaient une CV modérée (1000-10000 copie/ml), 68 avaient une CV élevée (10000-100000 copies/ml), pour 31 la CV était très élevée(>100000copies/ml). Sur cet effectif total 48 échantillons n'ont pas pu être génotypés en dépit de plusieurs tentatives et pour certains la totalité des aliquots ont été utilisés en vain. Ceci pourrait être expliquer par la dégradation des acides nucléiques au cours de la conservation au laboratoire dans un contexte d'instabilité de l'électricité qui influe sur le maintien de la chaine de froid.

❖ Etat des lieux de la résistance du VIH-1 aux ARV des HSHs au Sénégal

Sur les 92 échantillons qui ont pu être amplifiés et séquencés au niveau du gène Pol, 16/92 (17,40%) des souches avaient présenté au moins une mutation de résistance.

On a retrouvé 10 participants parmi les 62 participants naïfs de TAR ayant au moins une DRM, soit un taux de résistance primaire de 16,1% ; par ailleurs 06 parmi les 30 participants qui avaient déjà reçu un traitement ARV, présentaient au moins une DRM soit un taux de résistance secondaire de 20%.

La mutation T215S/Y était la plus représentée soit 4,8% (n=3/62) parmi les mutations portant sur les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) La mutation M184V est également retrouvée. Dans l'étude de **Kaba D. 2016**, la mutation M184V était la plus représenté soit 80%, elle confère une résistance de haut niveau à la 3TC/FTC et de bas niveau à l'ABC et la ddI (HIV Drug Resistance Database 2016). Les mutations de type TAMs conférant la résistance aux analogues de la thymidine (AZT/d4T) ont été retrouvées.

Les mutations portant sur les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ont été estimés à 12,9% (n=8/62) avec majoritairement la mutation K103N (21,21%). On y a retrouvé également les mutations V106M, V179E/T, V108I, A98G, V90I… La prédominance de la mutation K103N a été retrouvé dans l'étude de Kaba D. 2016

Par ailleurs, les résultats de génotypage ont montré une absence mutation de résistance n'a été trouvée sur le gène de la protéase.

Au terme de l'analyse phylogénétique, CRF02_AG était le plus prévalent 43/92 soit 46,74%, cependant le sous-type C était également fortement représenté 42/92 soit 45,65%. Le CRF02_AG était le plus représenté soit 84% dans l'étude de Kaba D. 2016 qui concerné la population générale alors que Leye N. et al 2013 avait trouvé une prédominance du sous-type C (46,8%) chez les HSHs de sa population d'étude, résultat retrouvé dans de nombreux études ainsi que le nôtre. Cependant l'émergence du sous-type CRF02_AG chez les HSHs conforte l'hypothèse que ce groupe représente une sentinelle pour transmission du VIH entre la population générale et les HSHs.

Une analyse approfondie des autres souches a permis de confirmer les sous-types B, CRF02_C, le CRF06_cpx et CRF09_cpx.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude réalisée dans le cadre du projet HP2.0 a permis de faire une mise à jour des données de résistance du VIH aux ARV chez les HSHs au Sénégal.

La prévalence du VIH reste élevée >30% dans cette population touchant particulièrement les jeunes de 18 à 24ans.

Le taux de résistance primaire était assez élevé :16,1% (12,5% pour les INNTI) alors que le taux de résistance secondaire (20%) était comparable à celle retrouvée dans la population générale. Le sous-type C généralement prédominante chez les HSHs est associée à une plus forte prévalence de la forme recombinante CRF02_AG.

Prises ensemble, ces données montrent l'ampleur de la résistance du VIH aux ARV malgré les avancées considérables dans la prise en charge thérapeutique du VIH et suggèrent:

- L'urgence de lutter contre la stigmatisation afin d'améliorer la prise en charge des HSHs ce qui réduira au même titre les cas de nouvelles infections induits par ce groupe à risque.
- L'importance de renforcer les programmes de rétention antirétrovirale et la mise en œuvre de la surveillance des résistances chez les HSHs

Perspectives

Au décours de ce travail nous envisageons:

- Evaluer l'évolution de la résistance secondaire après M6, M12, M18 et M24 de suivi sous TAR
- Elargir les sites d'études vers le nord, le sud et le centre du pays où les données sur les HSHs sont presque inexistantes
- Réaliser des génotypages pour les variants minoritaires qui échappent aux techniques qui sont utilisées en routine

Recommandations

A l'issue des résultats obtenus au cours de ce travail, nous recommandons:

- Au programme national de prise en charge du VIH/SIDA et de prévention des IST:
  - De tenir compte de ces nouvelles données pour l'élaboration des documents normatifs de prise en charge des HSHs
  - Mettre en place des programmes de surveillance de la résistance conformément aux recommandations de l'OMS
  - Former les agents de santé sur la prise en charge des patients associés à des groupes vulnérables

- Aux médecins
  - De renforcer le counseling des patients
  - De mettre en avant la collaboration clinico-biologique pour la prise en charge des patients
- Aux patients : respecter l'usage des préservatifs, d'éviter les comportements à risques et la compliance dans le traitement

REFERENCES

1. **Rapport annuel CNLS/ONUSIDA 2017** [cité 21 Aout 2017]. Disponible sur: http://www.cnls-senegal.org/bibliotheque/reports/
2. **Rapport annuel de l'ONUSIDA 2006.** [cité 31 Mai 2007]. Disponible sur: http://www.unaids.org/fr/resources/documents/annuel_report_pdf.
3. **Rapport ONUSIDA 2015.** Programme commun des nations unies sur le VIH/sida. [cité 31 Mars 2015].
   Disponible sur www.unaids.org/sites/default/files/media/GARPR2015guidelines.pdf
4. **Girard P-M, Katlama C, Pialoux G. 2011** VIH : édition 2011 [Internet]. Rueil Malmaison: Doin;
   Disponible sur: http://mediatheque.lecrips.net/index.php?lvl=notice_display&id=84525
5. **DC. 1981** Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep;30(25):305-8.
6. **Greene WC. 2007** A history of AIDS: Looking back to see ahead. Eur J Immunol.; 37(S1): S94-102.
7. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. 1983** Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 220(4599):868-71.
8. **Lo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. 1984** Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science. 224(4648):500-3.
9. **Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. 1984** Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science. 224(4648):497-500.
10. **Hladik F, McElrath MJ. 2011** Setting the stage: host invasion by HIV. Nat Rev Immunol.2008;8(6):447-57. En MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. N Engl J Med. 364(20):1943-54.
11. **Martine Peeters, Marie-Laure Chaix. 2013** Origine et diversité génétique du VIH : d'où vient-il, où va-t-il ? Volume 17, N°3
12. **Hemelaar J.2012** The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol Med. 18(3):182-92.

13. **Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, et al. 2003** Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1: Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. Clin Infect Dis. 2003;37(1):113-28
14. **Krebs CF, Hogan HT, Quiterio S, Gartner S, and Wigdahl B.** (**2013**) Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/WIGDAHL2001/Wigdahl.html [accessed 26/05/16].
15. **Freed EO. (2015).** HIV-1 assembly, release and maturation. Nat. Rev. Microbiol. 13(8): 484–96.
16. **Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, and Bieniasz PD. (2006).** Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. PLoS Biol. 80(24):12102-8.
17. **Carlton JG, and Martin-Serrano J. (2007).** Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. Science. 316(5833): 1908-12
18. **Wilen CB, Tilton JC, and Doms RW. (2012).** HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2.
19. **Adamson CS, and Freed EO. (2010).** Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. Antiviral Res. 85(1): 119-41.
20. **Goodsell DS. (2012).** Illustrating the machinery of life: viruses. Biochem. Mol. Biol. Educ. Bimon. Publ. Int. Union Biochem. Mol. Biol. 40(5): 291-6.
21. **Karn J, and Graeble M.A. (1992).** New insights into the mechanism of HIV-1 trans-activation. Trends Genet. TIG 8(11): 365-8.
22. **Rothe M, Israel N and Barre-Sinoussi F. (1996)** - Mécanismes de réplication virale des VIH. Médecine et thérapeutique; 2: 12-18
23. **Weiss RA. (1993).** Cellular receptors and viral glycoproteins involved retrovirus entry. In: Levy JA. ed. The retroviridae, vol.2, New York, Plenum, 1-108
24. **D'Souza M.P. And Harders V.A. (1996)**. Chemokines and HIV1 second receptors: Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. Nat Med; 2(12): 1293-300.
25. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S, and WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011).** Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS Lond. Engl. 25(5): 679-89.
26. **Niama FR, Toure-Kane C, Vidal N, Obengui P, Bikandou B, Ndoundou Nkodia MY, Montavon C, Diop-Ndiaye H, Mombouli JV, Mokondzimobe E, et al. (2006).** HIV-1

subtypes and recombinants in the Republic of Congo. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 6(5): 337-43.

27. **Peeters M, D'Arc M, and Delaporte E. (2014).** Origin and diversity of human retroviruses. AIDS Rev. 16(1): 23–34.
28. **Villabona-Arenas CJ, Domyeum J, Mouacha F, Butel C, Delaporte E, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, and Aghokeng AF. (2015).** HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Dis. 36, 210-16.
29. **Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier J-C, and Simon F. (2011).** HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. Lancet Lond. Engl. 378, 1894.
30. **Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond, F, Robertson DL, and Simon F. (2009).** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat. Med. 15(8): 871–2.
31. **Toure-Kane, C, Montavon, C, Faye, M A, Gueye, P M, Sow, P S, Ndoye, I, Gaye-Diallo, A, Delaporte, E, Peeters, M, Mboup, S, (2000)**. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. AIDS Res. Hum. Retroviruses 16, 603–9
32. **Diop-Ndiaye, H., Toure-Kane, Coumba, Leye, N., Ngom-Gueye, N.F., Montavon, Céline, Peeters, Martine, Mboup, Souleymane, (2010)**. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients from Senegal. AIDS Res. Hum. Retroviruses 26, 1133–8
33. **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.; 20:206-14.
34. **Peeters M, Jung M, and Ayouba A (2013).** The origin and molecular epidemiology of HIV. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 11(9): 885–96.
35. **Lewden C, Chene G, Morlat P, et al. 2007** HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm3 on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. J Acquir Immune Defic Syndr; 46: 72–7.
36. **Lundgren JD, Babiker AG, et al. 2015** Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. N Engl J Med. 373: 795–807.

37. **Morlat P, 2013** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Actualisations 2014 du rapport 2013.pdf. Available at: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/experts-vih_actualisations 2014.pdf. Accessed October 5, 2015.
38. **Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, et al. 2006** Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. N Engl J Med. 354: 251–60.
39. **Landman R, Schiemann R, Thiam S, Vray M, Canestri A, Mboup S, Kane CT, Delaporte E, Sow PS, Faye MA, Gueye M, Peytavin G, Dalban C, Girard PM and Ndoye I. (2003) -** Once-a-day highly active antiretroviral therapy in treatment-naive HIV-1 infected adults in Senegal. AIDS; 17:1017-22
40. **Weiss R .A. (2001) -** Nature; 410; 954.
41. **Katlama C, Pialoux G and Girard PM. (2004) -** Thérapeutiques antirétrovirales In: Katalma C, Pialoux G, Girard PM.VIH. Paris: Doin ;(25) : 299-337
42. **Jiang S, Lu H and Liu S. (2003) -** Novel small molecule HIV entry inhibitors targeting gp41. The 2nd IAS conference on HIV pathogenesis and treatment, Paris (France).
43. **Saag M, Goodrich J, Fätkenheuer G, et al.** A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment-experienced patients infected with non-R5 HIV-1. J Infect Dis 2009; 199: 1638–47.
44. **Soulié C, Lambert-Niclot S, Fofana DB, et al.** Frequency of amino acid changes associated with resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in R5- and X4-tropic HIV-1 subtype B. J Antimicrob Chemother 2013; 68: 1243–5.
45. **Grant RM, Lama JR, Anderson PL, et al.** Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. N Engl J Med 2010; 363: 2587–99.
46. **Balakrishnan P, Saravanan S and Kumarasamy N. (2006) -** Résistance de drogue de HIV-1 de Suniti parmi les patients non traités en Inde : État actuel. J Postgrad Med; 52: 183-186.
47. **Perez-Bercoff D, Wurtzer S, Compain S, Benech H and Clavel F. (2007)** - Human immunodeficiency virus type 1: resistance to nucleoside analogues and replicative capacity in primary human macrophages. J Virol; 81(9):4540-50.
48. **Marcelin AG. Derache A, Traore O, Koita V, Sylla A, Tubiana R, Simon A, Canestri A, Carcelain G, Katlama C, Calvez V and Cisse M. (2007) -** Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. Antivir Ther;12(1):123-9.

49. **Delaugerre C, Flandre P, Marcelin AG, Descamps D, Tamalet C, Cottalorda J, Schneider V, Yerly S, LeGoff J, Morand-Joubert L, Chaix ML, Costagliola D and Calvez V. (2008) -** National survey of the prevalence and conditions of selection of HIV-1 reverse transcriptase K70E mutation. J Med Virol, 80(5):762-5
50. **Soo-Huey Yap, Chih-Wei Sheen, Jonathan Fahey, Mark Zanin, David Tyssen, Viviane Dias Lima, Brian Wynhoven, Michael Kuiper, Nicolas Sluis-Cremer, P. Richard Harrigan and Gilda Tachedjian. (2007) -** N348I in the Connection Domain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Zidovudine and Nevirapine Resistance. PLoS Medicine www.plosmedicine.org.

51. **Hachiya A, Kodama EN, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H and Oka S. (2008**) - Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors ;J Virol; 82(7):3261-70.
52. **Clavel F and Hance AJ. (2004) -** HIV drug resistance. N Engl J Med; 4; 350(10):1023-35.
53. **Yong Gao, Ellen Paxinos, Justin Galovich, Ryan Troyer, Heather Baird, Measho Abreha, Cissy Kityo, Peter Mugyenyi, Christos Petropoulos, and Eric J. (2004) -** Characterization of a Subtype D Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate That Was Obtained from an Untreated Individual and That Is Highly Resistant to Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors J Virol; 78(10): 5390–5401.
54. **Martin M. Zdanowicz PhD. (2006) -** The Pharmacology of HIV Drug Resistance. American Journal of Pharmaceutical Education; 100; 70 (5).
55. **Menéndez-Arias L (2013).** Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. Antiviral Res. 98, 93–120.
56. **Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, and Richman DD (2015).** 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Top. Antivir. Med. 23(4): 132–41.
57. **Monleau M, Aghokeng AF, Nkano BA, Chaix M-L, Peeters M, and AC11/AC12 ANRS Working Group (2012).** Drug resistance mutations of HIV type 1 non-B viruses to integrase inhibitors in treatment-naive patients from sub-saharan countries and discordant interpretations. AIDS Res. Hum. Retroviruses 28(9): 1157–60.

58. **Oswald-Richter K, Grill SM, Leelawong M, Tseng M, Kalams SA, Hulgan T, Haas DW and Unutmaz D. (2007) -** Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection PLoS Pathog; 3(4):e58.
59. **Hertogs K, de Béthune MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, Van Den Eynde C, Van Gerwen V, Azijn H, Van Houtte M, et al. (1998).** A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 42(2): 269–76.
60. **Kellam P, and Larder BA. (1994).** Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 38(1): 23–30.
61. **Eshleman SH, Hackett J, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, Devare SG, Zekeng L, Kaptué L, and Marlowe N. (2004).** Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. J. Clin. Microbiol. 42(6): 2711–17.
62. **Grant RM, Kuritzkes DR, Johnson VA, Mellors JW, Sullivan JL, Swanstrom R, D'Aquila RT, Van Gorder M, Holodniy M, Lloyd Jr RM, et al. (2003).** Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. J. Clin. Microbiol. 41(4): 1586–93.
63. **Jenabian M-A, Talla F, Talla P, Mbopi-Kéou F-X, Charpentier C, Kane CT, and Bélec L. (2015).** Pitfalls of antiretroviral drug resistance genotyping of HIV-1 Group M and Group N from Cameroon by sequenced-based assays. Niger. Med. J. 56(6): 420–4.
64. **Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, and 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.
65. **Mouafo LCM, Péré H, Ndjoyi-Mbiguino A, Koyalta D, Longo JDD, Mbopi-Kéou F-X, Kane CT, and Bélec L. (2015).** LETTER TO THE EDITOR Performance of the ViroSeq® HIV-1 Genotyping System v2.0 in Central Africa. Open AIDS J. 9: 9–13.
66. **Thiam M, Diop-Ndiaye H, Kebe K, Vidal N, Diakhate-Lô R, Diouara AAM, Leye N, Ndiaye O, Sow A, Ngom-Gueye NF, et al. (2013).** Performance of the ViroSeq HIV-1 genotyping system v2.0 on HIV-1 strains circulating in Senegal. J. Virol. Methods 188(1-2): 97–103.

67. **Aitken SC, Bronze M, Wallis CL, Stuyver L, Steegen K, Balinda S, Kityo C, Stevens W, Rinke de Wit TF, and 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
68. **Inzaule S, Yang C, Kasembeli A, Nafisa L, Okonji J, Oyaro B, Lando R, Mills LA, Laserson K, Thomas T, et al. (2013).** Field Evaluation of a Broadly Sensitive HIV-1 In-House Genotyping Assay for Use with both Plasma and Dried Blood Spot Specimens in a Resource-Limited Country. J. Clin. Microbiol. 51(2): 529–39.
69. **Manasa J, Danaviah S, Pillay S, Padayachee P, Mthiyane H, Mkhize C, Lessells RJ, Seebregts C, de Wit TFR, Viljoen J, et al. (2014).** An Affordable HIV-1 Drug Resistance Monitoring Method for Resource Limited Settings. J. Vis. Exp; 85.
70. **Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, Touré-Kane C, Truong LXT, Chaix M-L, Delaporte E, et al. (2014).** Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. J. Clin. Microbiol. 52(2): 578–86.
71. **Zhou Z, Wagar N, DeVos JR, Rottinghaus E, Diallo K, Nguyen DB, Bassey O, Ugbena R, Wadonda-Kabondo N, McConnell, MS, et al. (2011).** Optimization of a Low Cost and Broadly Sensitive Genotyping Assay for HIV-1 Drug Resistance Surveillance and Monitoring in Resource-Limited Settings. PLoS One 6(11): e28184.
72. **Inzaule SC, Ondoa P, Peter T, Mugyenyi PN, Stevens WS, de Wit TFR, and Hamers, RL. (2016).** Affordable HIV drug-resistance testing for monitoring of antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. Lancet Infect. Dis.
73. **Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74(12): 5463–7.
74. **Brenner S (2014).** Frederick Sanger (1918–2013). Science 343(6168): 262.
75. **Bigaillon C, Mérens A, Rapp C. 2010** Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne. Rev Francoph Lab.2010; (422):69-82.
76. **Charpentier C, Camacho R, Ruelle J, Eberle J, Gürtler L, Pironti A, Stürmer M, Brun-Vézinet F, Kaiser R, Descamps D, et al. (2015).** HIV-2EU—Supporting Standardized HIV-2 Drug-Resistance Interpretation in Europe: An Update: Table 1. Clin. Infect. Dis. 61(8): 1346–7.

77. **Wagner S, Kurz M, Klimkait T, and Swiss HIV Cohort Study (2015).** Algorithm evolution for drug resistance prediction: comparison of systems for HIV-1 genotyping. Antivir. Ther. 20(6): 661–5.
78. **Fofana DB, Soulie C, Balde A, Lambert-Niclot S, Sylla M, Ait-Arkoub Z, Diallo F, Sangare B, Cisse M, Maiga IA, et al. (2014).** High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali. J. Antimicrob. Chemother. 69(9):2531-5
79. **Jiamsakul A, Sungkanuparph S, Law M, Kantor R, Praparattanapan J, Li PCK, Phanuphak P, Merati T, Ratanasuwan W, Lee CKC, et al. (2014).** HIV multi-drug resistance at first-line antiretroviral failure and subsequent virological response in Asia. J. Int. AIDS Soc.; 17: 19053.
80. **Longo Jean De Dieu.** Groupe à haut risque d'infection à VIH en République Centrafricaine : Classification et intervention, 2016, N° 570
81. **Rapport annuel CNLS/ONUSIDA 2014 :** Etude ELIHoS 2007/2014. Disponible sur: http://www.cnls-senegal.org/bibliotheque/reports/
82. **Billong SC, Fokam J, Essi MJ, Nguefack-Tsague G, Billong E J, Papworth E, Nfetam Elat JB. 2013** Prévalence de l'Infection à VIH et comportements sexuels chez les Hommes Homosexuels dans la Ville de Yaoundé au Cameroun. Health Sci. Dis: Vol 14 (2)
83. **Bangoura N, Diouara AAM, Cissé M, Ndiaye HD, Mboup S, Ayouba A, et al. 2015** Quantification de la Charge Virale et tests de résistance du VIH-1 aux ARV à partir d'échantillons DBS (Dried Blood Spots) chez des patients Guinéens sous traitement antirétroviral. Afr J Lab Med. 4(1):7 pages.
84. **Diouara AAM, Diop-Ndiaye H, Kebe-Fall K, Tchiakpè E, Ndiaye O, Ayouba A, et al. 2014** Dried blood spots for HIV-1 drug resistance genotyping in decentralized settings in Senegal. J Med Virol. 86(1):45-51.
85. **Kaba Djiba.** Etats des lieux de la résistance secondaire du VIH-1 aux ARV en Guinée, 2016, N°032