

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

**\*\*\*\*\***

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIET D'ODONTOLOGIE**

**\*\*\*\*\***

ANNEE 2018



N° .....

**ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DU VIH-1 AUX  
ANTIRÉTROVIRAUX CHEZ DES PATIENTS NAÏFS AU MALI**

**MEMOIRE**

**MASTER DE MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

**PRESENTE ET SOUTENU PUBLIQUEMENT**

**LE 21/12/2018**

**PAR**

**Hamadoun MAÏGA**

**Né le 28 Juillet 1985**

**MEMBRES DU JURY :**

**Président :** M. Cheikh Saad-Bouh BOYE, Professeur  
**Membres :** Mme Ndeye Coumba TOURE-KANE, Professeur  
Mme Halimatou DIOP-NDIAYE, Maître de Conférences  
Agrégé  
M. Babacar MBENGUE, Maître de Conférences Agrégé  
**Directrice de memoire :** Mme Ndeye Coumba TOURE-KANE, Professeur  
**Co-directeur de memoire :** M. Almoustapha I. MAIGA, PHD Virologie

## Remerciements

Je remercie Allah et le prophète Mohamed (PSL) de m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à toutes celles et à tous ceux qui m'ont accompagné tout le long de ce travail de mémoire:

Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE,

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury,

Votre rigueur scientifique et vos qualités humaines nous ont fascinés à plus d'un titre,

Veillez trouver ici l'expression de mes profonds remerciements.

Madame la Directrice de recherche Professeur Ndeye Coumba TOURE-KANE,

Pour la confiance que vous m'avez faite en acceptant d'encadrer mon travail de mémoire,

Pour votre expertise et votre parcours professionnel admirable,

Je vous exprime ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Madame le Professeur Halimatou DIOP-NDIAYE,

Pour m'avoir ouvert les portes de votre unité,

Pour m'avoir donné l'opportunité d'acquérir des expériences techniques et opérationnelles dans le domaine passionnant de la recherche qu'est la Biologie Moléculaire,

Veillez trouver ici le témoignage ma gratitude.

Monsieur le Professeur Babacar MBENGUE,

Pour avoir accepté de lire et rapporter ce travail,

Veillez trouver ici l'expression de mes profonds remerciements.

Monsieur le Docteur Almoustapha I. MAIGA,

Pour avoir accepté de co-encadrer ce travail,

Pour votre rigueur scientifique et votre disponibilité à échanger sur toutes les problématiques techniques et opérationnelles liées au VIH-SIDA,

Veillez trouver ici l'assurance de mes sincères remerciements.

Mesdames les Docteurs Khady KEBE-FALL et Nafissatou LEYE-DIOUF,

Pour votre encadrement chaleureux lors de ce travail, vos nombreux conseils avisés et votre grande disponibilité.

Messieurs les Docteurs, amis et frères Mba Elhadji Bambo DIAKHABY, Allaye TRAORE et Aboubacry DRAME, Djiba KABAet Aristid Ekollo MBANGE,

Pour votre touchant et infaillible soutien!

Le laboratoire de bactériologie virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec spécialement l'unité de Biologie Moléculaire,

Pour sa sympathie et sa chaleur,

Pour m'avoir si bien accepté,

Un merci infini pour votre accueil et surtout : meilleur à vous !

Aux patients,

Parce que l'accès aux soins est un droit universel,

Je vous souhaite d'avoir une vie meilleure.

Le consortium WANETAM,

Pour nous avoir permis de réaliser cette étude.

Je remercie ma famille d'être une nouvelle fois présente à mes côtés,

A la grande famille Dieuppeul : MERCI !,

Une mention toute spéciale pour mes Tantes Mme MAIGA Djénèba MAIGA et Mme GUISSÉE Ina, pour mon oncle Aliou MAIGA et sa femme et pour feu Le Professeur Gangaly DIALLO dont l'absence nous est si pénible.

## Résumé

### Évaluation de la Résistance du VIH-1 aux ARVs chez des patients naïfs de traitement au Mali (Projet WANETAM)

#### Problématique

L'émergence des mutations de résistance est devenue une préoccupation majeure au cours du Traitement ARV (TAR) avec le risque de transmission de virus résistants au sein de la population naïve. La surveillance de la résistance transmise est donc essentielle pour garantir le succès thérapeutique. Ce travail avait pour objectif d'évaluer la fréquence de la résistance transmise chez les patients naïfs de TARV au Mali dans le cadre du projet WANETAM.

#### Méthode

Entre juin 2015 et septembre 2016, des patients naïfs de TARV âgés de moins de 26 ans et/ou un taux de lymphocytes T CD4 (LTCD4) $>500$  cellules/mm<sup>3</sup> ont été inclus. Des prélèvements de sang effectués sur tube EDTA ont permis de recueillir le plasma qui a été acheminé au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU Aristide le Dantec (Dakar, Sénégal) pour le génotypage de résistance. L'amplification génique suivie du séquençage nucléotidique a ciblé les 240 premiers acides aminés du gène de la RT selon le protocole du groupe de travail ANRS AC11 pour déterminer la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI). L'analyse des mutations de résistance a utilisé la liste SDRM version 2009 de l'université de Stanford.

#### Résultats

Quarante-neuf patients ont été inclus. Le sex-ratio (H/F) était de 0,14, l'âge moyen de 22 ans (18-25 ans) et la médiane de LTCD4 de 139 cellules/mm<sup>3</sup>. Trente-huit (77,55%) échantillons ont été amplifiés et séquencés. L'analyse des mutations a montré 1 (2,63%) échantillon résistant aux INTI avec M184V et K65R et 4 (10,53%) aux INNTI avec L100I, Y188L, K103N et Y181C. Le taux global de résistance transmise est de **10,53%** (4/38).

#### Conclusion

Ces résultats de TDR au Mali montrent un niveau modéré de résistance transmise et impose une surveillance rapprochée et une éducation pré-thérapeutique pour assurer une efficacité à long terme des premières lignes de TAR.

## **Abstract**

### **Evaluation of HIV-1 resistance to ARVs in treatment-naïve patients in Mali (WANETAM project)**

#### **Problematic**

The emergence of resistance mutations has become a major concern during ARV treatment (ART) with the risk of transmission of resistant viruses within the naive population. Monitoring transmitted resistance is therefore essential to ensure therapeutic success. The objective of this work was to evaluate the frequency of resistance transmitted in ART-naive patients in Mali as part of the WANETAM project.

#### **Method**

Between June 2015 and September 2016, ART-naïve patients younger than 26 years of age and / or CD4 + T cell count (LTCD4) > 500 cells / mm<sup>3</sup> were included. Blood samples taken on EDTA tubes were used to collect the plasma that was sent to the Bacteriology-Virology laboratory at CHNU Aristide le Dantec (Dakar, Senegal) for resistance genotyping. Gene amplification followed by nucleotide sequencing targeted the first 240 amino acids of the RT gene according to the ANRS AC11 working group protocol to determine resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase (NNRTI). Resistance mutation analysis used the SDRM version 2009 list from Stanford University.

#### **Results**

Forty-nine patients were included. The sex ratio (M / F) was 0.14, the mean age was 22 years (18-25 years) and the median LTCD4 was 139 cells / mm<sup>3</sup>. Thirty-eight (77.55%) samples were amplified and sequenced. Mutational analysis showed 1 (2.63%) NRTI-resistant sample with M184V and K65R and 4 (10.53%) NNRTIs with L100I, Y188L, K103N and Y181C. The overall resistance rate transmitted is 10.53% (4/38).

#### **Conclusion**

These results from RDTs in Mali show a moderate level of transmitted resistance and require close monitoring and pre-therapeutic education to ensure long-term effectiveness of the first ART lines.

## Liste des figures

Figure 1. Phylogénie représentant les sept genres de la famille des <i>Retroviridae</i> .....	5
Figure 2. Structure du VIH dessiné à la main à partir des données de biologie structurale, de biophysique et de microscopie. ....	6
Figure 3. Structure génomique de la souche de référence du VIH-1 (HXB2, numéro d'accèsion GenBank K03455). ....	7
Figure 4. Assemblage et maturation du VIH. ....	8
Figure 5. Schéma des étapes du cycle de réplication viral montrant les différentes formes d'acides nucléiques du VIH présents dans la cellule infectée. ....	11
Figure 6. Mécanisme de formation d'un virus recombinant ....	12
Figure 7. Evolution 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). . ....	14
Figure 8. Phylogénie représentant la large diversité des souches issues de la lignée VIH-1/ SIVcpz/SIVgor.....	17
Figure 9. Schéma de la barrière génétique et de la puissance des principaux ARVs couramment utilisés.....	26
Figure 10. Mutations de résistance aux INTIs et INNTI.....	27
Figure 11. Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs.....	29
Figure 12. Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs.....	30
Figure 13. Stratégie pour le suivi et la surveillance de la résistance du VIH aux antirétroviraux.....	32
Figure 14. Répartition des souches en fonction des sous-types.....	41
Figure 15. Arbre phylogénétique des souches (RT, 773 pb).....	42
Figure 16. Evolution de la résistance transmise dans les pays du Nord et du Sud.....	61

## Liste des tableaux

Tableau I. Schémas thérapeutiques recommandés par l’OMS dans les pays du Sud en 2016.....	19
Tableau II. Caractéristiques des principales INTIs.....	20
Tableau III. Principales caractéristiques des INNTIs.....	22
Tableau IV. Caractéristiques des principales IPs.....	23
Tableau V. Caractéristiques des INIs.....	25
Tableau VI. Algorithme d’interprétation 2015 des profils de résistance selon l’ANRS : inhibiteurs de fusion.....	31
Tableau VII. Description générale de la population d’étude.....	40
Tableau VIII. Répartition des patients en fonction du taux de LT CD4 <sup>+</sup> .....	40
Tableau IX. Mutations de résistance portant sur les INTIs et les INNT.....	43

## Liste des molécules antirétrovirales (ARVs)

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
COBI	Cobicistat
d4T	Stavudine
ddI	Didanosine
DRV	Darunavir
DTG	Dolutégravir
EFV	Efavirenz
ETV	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FTC	Emtricitabine
FPV	Fosamprénavir
IDV	Indinavir
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
NVP	Névirapine
RAL	Raltégravir
RPV	Rilpivirine
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TAF	Ténofovir alafénamide fumarate
TDF	Ténofovir disoproxil fumarate
TPV	Tipranavir

## Liste des abbreviations

ADN / DNA acide désoxyribonucléique / deoxyribonucleic acid

ADNc ADN complémentaire

ANRS Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales

ARN / RNA acide ribonucléique / ribonucleic acid

ARNm ARN messenger

ARVs antirétroviraux / antiretroviral drugs

CA capsid

CCR5 récepteurs chimiokines de surface C-C type 5 / C-C chemokine Receptor type 5

CD4 cluster de différenciation de type 4

CD8 cluster de différenciation de type 8

CDC Center for Disease Control and Prevention

CRF formes recombinantes circulantes / Circulating Recombinant Forms cp comprimé

CV / VL charge virale / viral load

CXCR4 récepteurs chimiokines de surface C-X-C type 4 / C-X-C chemokine Receptor type4

EDTA acide éthylène diamine tétra-acétique / ethylenediaminetetraacetic acide

ELISA test immuno-enzymatique / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

*Env* enveloppe / envelope

*gag* antigène spécifique de groupe / group-specific antigen

GALT tissu lymphoïde associé au tube digestif / Gut Associated Lymphoid Tissue

gp41 glycoprotéine transmembranaire 41

gp120 glycoprotéine de surface 120

gp160 précurseur glycoprotéine 160

HIVDR HIV drug resistance

IN intégrase / Integrase

INI inhibiteur d'intégrase / integrase inhibitor

INNTI / NNRTI inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse / non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

INTI / NRTI inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse / non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

IP Inhibiteur de la protéase / protease inhibitor

kDa kilodalton

LAV virus associé à une lymphadénopathie / Lymphadenopathy Associated Virus

LTR longues répétitions terminales / Long Terminal Repeats

MA matrice

NC nucléocapside

*nef* négative factor

OMS / WHO Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization

ONUSIDA / UNAIDS Organisation des Nations Unies pour la lutte contre le VIH/SIDA /

PCR Polymerase Chain Reaction

p6 protéine 6

p1 protéine 17

p24 protéine 24

pb / bp paires de bases / base pairs

*pol* polymérase / polymerase

PTME prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant

PR Protéase / Protease

Pr55 Gag Protéine précurseur 55 Gag

Pr160 Gag-Pol Protéine précurseur 160 Gag-Pol

*Rev* protéine régulatrice de l'expression du VIH / HIV Regulator of Virion expression

RNase H ribonucléase H

RT Transcriptase Inverse / Reverse Transcriptase

RT-PCR / Reverse Transcription PCR

TAMs thymidine analogue mutations

TAR / ART Traitement antirétroviral / antiretroviral treatment

*Tat* protéine trans-activatrice du VIH / HIV-Trans-Activating

TDR résistance transmise / transmitted drug resistance,

*vif* facteur d'infectivité viral / viral infectivity factor

VIH/HIV Virus de l'Immunodéficience Humaine / Human Immunodeficiency Virus

VIH-1 / HIV-1 VIH de type 1

VIH-2 / HIV-2 VIH de type 2

*Vpr* protéine virale R / viral protein R

*Vpu* protéine virale unique / viral protein unique

*Vpx* protéine virale X / viral protein

## Sommaire

Introduction.....	1
<b>PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>2</b>
1. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : .....	3
1.1. Histoire de la découverte du VIH/SIDA .....	4
1.2. Généralités sur le VIH :.....	4
1.3. Origine et classification du VIH:.....	16
2. Traitement antirétroviral: .....	18
3. Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales: .....	25
4. Surveillance de la résistance: .....	31
5. Analyse et interprétation de la résistance:.....	33
<b>DEUXIEME PARTIE : Travaux de mémoire.....</b>	<b>36</b>
1. Matériel Et méthodes: .....	36
1.1. Cadre, type d'étude et critères de sélection des patients :.....	36
1.2. Prélèvement et conservation des échantillons :.....	36
1.3. La taille des échantillons :.....	37
1.4. Analyses au laboratoire :.....	37
1.5. Aspects éthiques et réglementaires :.....	39
2. Résultats et Discussion: .....	40
2.1. Résultats :.....	40
2.2. Discussion: .....	43
Conclusion et perspectives:.....	46
Recommandations:.....	46
Bibliographies .....	47
Annexes .....	54



## Introduction

Depuis leur introduction, les traitements de l'infection par le VIH ont sauvé des millions de vie aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (OMS Rapport résistance 2012; ONUSIDA 2014). Selon le dernier rapport de l'OMS **36,9 [31,1-43,9] millions** de personnes vivaient avec le VIH en fin 2017 dont près de 70% (25,5 [23-28,8] millions) en Afrique subsaharienne. Environ **940 000** [670 000-1,3] personnes sont décédées de causes liées au sida dans le monde et l'Afrique subsaharienne paye un lourd tribut. En fin 2017, **21,7** [19,1-22,6] millions (53%) de PvVIH (Personnes vivant avec le VIH) étaient sous ARV (OMS 2017; ONUSIDA 2017). Ces résultats ont permis de réduire de 48% le nombre de décès liés au VIH entre 2005 et 2016 en Afrique subsaharienne (ONUSIDA 2017). Dans cette région, les trithérapies de première ligne recommandées par l'OMS et qui ont largement démontré leur efficacité combinent 2 Inhibiteurs Nucléotidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) et 1 Inhibiteur Non-nucléotidique de la Transcriptase Inverse (INNTI) (Laurent et al. 2002; Danel et al. 2009; Eholié et al. 2009).

Au Mali, la cinquième enquête démographique et de santé (EDS M-V), réalisée en 2012 a montré une baisse du taux de prévalence de 1,3% à 1,1% faisant du Mali un pays à faible prévalence avec une tendance à la stabilisation. Lancée en 2004, l'IMAARV (Initiative Malienne d'Accès aux ARV) a été marquée par un engagement politique fort en faveur de la lutte contre le VIH qui s'est traduit par la gratuité des ARV. A ce jour, le pays compte 85 sites de traitement, 347 sites PTME et 74 sites de prise en charge pédiatrique. A la fin de l'année 2012, 28.51 patients étaient suivis régulièrement. Les traitements antirétroviraux reposent sur 2 INTI +1 INNTI en première intention et en deuxième intention 2INTI+1 IP/r.

L'émergence de la résistance aux antirétroviraux, compromettant leur efficacité thérapeutique, est un problème qui est très vite apparu aussi bien dans les pays riches que dans ceux en développement. Des niveaux élevés de résistance aux ARV dans la population pourraient potentiellement restreindre les options thérapeutiques futures et augmenter le coût du traitement en rendant nécessaire l'utilisation de nouvelles combinaisons d'ARV (OMS Rapport résistance 2012). Ces mutations de résistance apparaissent sous l'effet d'une pression médicamenteuse sous-optimale qui favorise la multiplication du virus en présence d'ARV.

À cette préoccupation s'ajoute le risque de transmission de ces virus résistants au sein de la population naïve non encore traitée pour qui les combinaisons de première ligne ne seraient plus efficaces (Little 2000; Wensing et al. 2005; Shet et al. 2006; Chaix et al. 2009; Descamps et al. 2010).

La détection des mutations de résistance et la surveillance de la résistance transmise sont essentielles pour traiter au mieux les patients infectés par le VIH.

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine reste donc, malgré les progrès thérapeutiques effectués et une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection, un problème de Santé Publique. Les efforts doivent être poursuivis, notamment en

recherche, mais aussi au niveau de l'accès au traitement dans les pays en voie de développements, déjà nettement amélioré.

Dans le but de disposer de données récentes sur la circulation des souches résistantes chez les patients naïfs de TARV au Mali et de pouvoir adapter les schémas de première ligne à ces nouvelles données, nous nous sommes proposés d'évaluer la résistance primaire du VIH-1 aux ARV chez des patients naïfs de TARV. Cette étude, initiée et financée par le projet WANETAM (West African Network against Tuberculosis AIDS and Malaria) qui est un projet multicentrique, s'est déroulée dans six (6) pays dont quatre (4) du consortium WANETAM à savoir le Burkina Faso, **le Mali**, le Nigéria et le Sénégal et deux (2) autres pays ouest-africain , la Guinée et la Mauritanie.

Ce travail avait pour objectif :

Evaluer la fréquence de la résistance transmise (HIVDR) chez les patients naïfs de TARV dans le contexte de la décentralisation du traitement antirétroviral.

Pour mener à bien ce travail de mémoire, nous l'avons divisé en deux parties. Dans la première partie nous aborderons les généralités sur le VIH et dans la deuxième partie nous indiquerons le matériel et les méthodes et les résultats qui seront ensuite discutés avant de terminer par une conclusion, des perspectives et des recommandations.

## **PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique**

## **1. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) :**

### **1.1. Histoire de la découverte du VIH/SIDA**

Le 5 juin 1981, les premiers cas de syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ont été décrits dans le bulletin hebdomadaire « Morbidity and Mortality Weekly Report » (MMWR) de l'agence de santé et de sécurité publique américaine (Centres pour le Contrôle et la prévention des maladies (CDC, 1981a).

A la fin de l'année 1982, cette maladie de cause inconnue est nommée SIDA par le CDC. Après avoir rapidement mis hors de cause l'usage de nitrites d'alkyles (« poppers »), l'hypothèse d'un agent infectieux transmissible par voie sexuelle et sanguine est admise. Plusieurs cas de transmission hétérosexuelle seront ensuite observés chez des femmes, suivis par des cas de transmission de la mère à l'enfant (Harris et al., 1983; Ragni et al., 1985; Ziegler et al., 1985).

F. Barré-Sinoussi et L. Montagnier ont reçu conjointement en 2008 le prix Nobel de Médecine pour avoir détecté une activité de transcriptase inverse dans des biopsies de patients infectés (Barré-Sinoussi et al., 1983; Pincock, 2008).

Le nouveau rétrovirus isolé et mis en évidence par microscopie électronique avait été appelé virus associé à une lymphadénopathie (LAV), puis séquencé rapidement (Wain-Hobson et al., 1985).

Enfin, en 1986, l'équipe de l'Institut Pasteur de Paris isolait un deuxième type de virus chez deux patients originaires d'Afrique de l'Ouest. La même année, le Comité International de la Taxonomie des Virus (CITV) attribue le nom de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à l'agent étiologique du SIDA : respectivement VIH-1 et VIH-2 (Coffin et al., 1986).

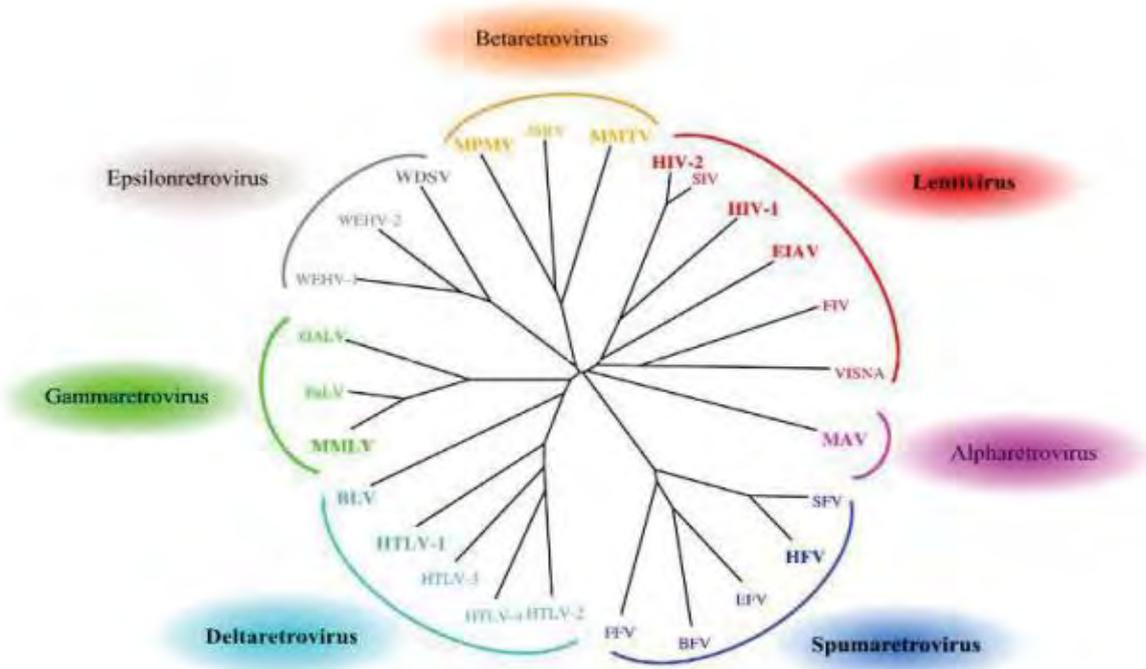
Après une trentaine d'années de travaux de recherche, l'origine située en Afrique Centrale et la diffusion du virus VIH-1 M, responsable de l'épidémie mondiale, sont désormais clairement établies (D'arc et al., 2015; Faria et al., 2014; Keele et al., 2006).

### **1.2. Généralités sur le VIH :**

#### **1.2.1. Taxonomie et structure :**

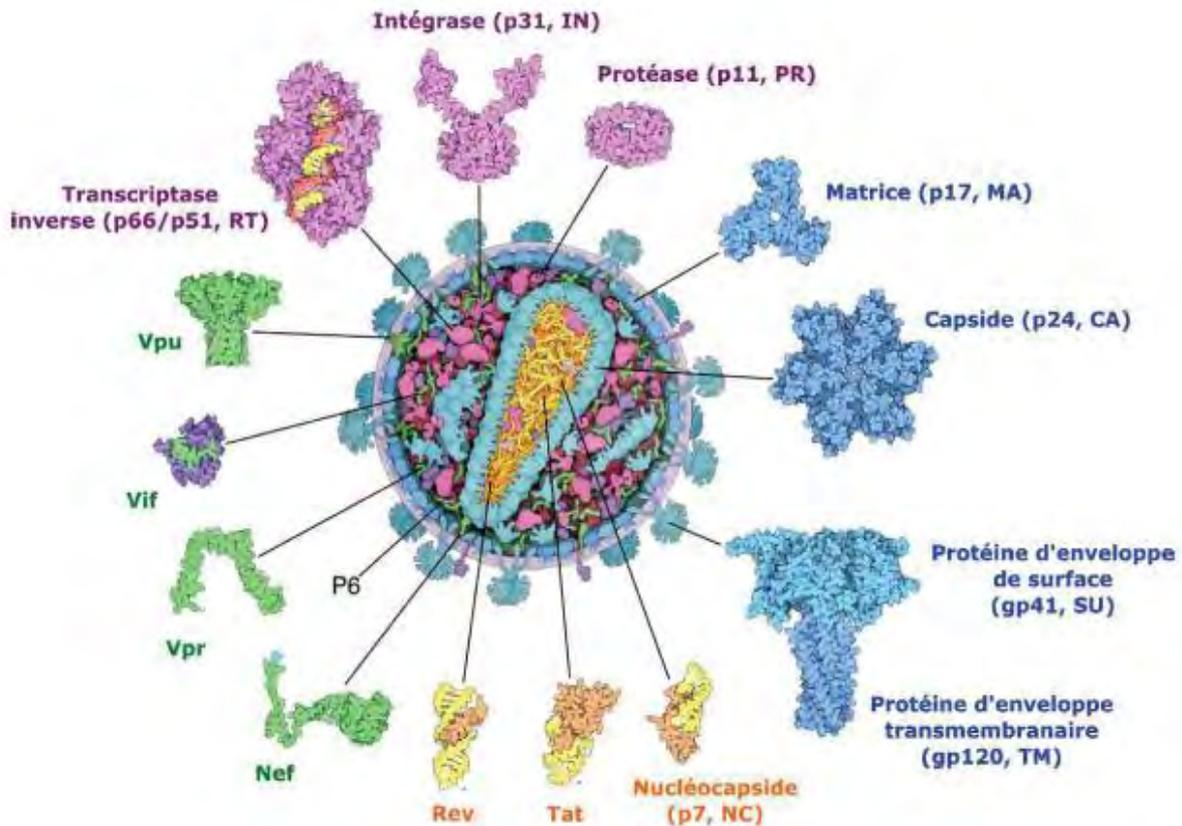
Le VIH est un virus du genre *Lentivirus*, qui appartient à la famille des *Retroviridae* (rétrovirus). Le génome des rétrovirus est composé de deux brins d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire (polarité positive) et ces virus ont la caractéristique de se répliquer grâce à la reverse transcriptase (RT). La RT est une enzyme polymérase qui traduit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), pour former un ADN double-brin (provirus) capable de s'insérer dans le génome de la cellule hôte. Les rétrovirus sont subdivisés en deux sous-familles et 7 genres suivants : 1) la sous-famille des *Orthoretrovirinae* (genres *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*) ; 2) sous-famille des *Spumaretrovirinae* (genre *Spumaretrovirus*) (Figure 1) (Coffin et al., 1997; Tözsér, 2010).

Les rétrovirus sont des virus sphériques d'environ 80 à 180 nanomètres (nm) de diamètre. Ils possèdent une enveloppe externe composée d'une bicouche lipidique cellulaire contenant des glycoprotéines d'enveloppes virales. Cette enveloppe, tapissée à l'intérieur par une matrice (MA), entoure la capsid virale (CA) qui contient le génome, la nucléocapside (NC) et les enzymes nécessaires à la réplication virale (Figure 2). Les rétrovirus simples (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, et *Epsilonretrovirus*) possèdent les trois gènes de structure gag, pol et env, qui codent respectivement pour les protéines de structure, enzymatique et d'enveloppe (Weiss, 2006). Les *Lentivirus*, avec les *Deltaretrovirus* et les *Spumaretrovirus*, sont des rétrovirus complexes car en plus des gènes de structure, ils possèdent aussi des gènes accessoires et régulateurs.



**Figure 1 : Phylogénie représentant les sept genres de la famille des Retroviridae (modifiée d'après Tözsér, 2010).**

L'arbre a été construit en utilisant les séquences protéiques du gène protéase des souches de références représentant chacun des genres : Alpharetrovirus (MAV : virus de la myélobastose aviaire), Betaretrovirus (MPMV : virus de Mason-Pfizer de singe ; JSRV : rétrovirus Jaagsiekte de mouton ; MMTV : virus de la tumeur mammaire de la souris), Deltaretrovirus (HTLV : virus T-lymphotrophique humain ; BLV : virus de la leucémie bovine), Epsilonretrovirus (WEHV : virus de l'hyperplasie épidermique du saumon ; WDSV : virus du sarcome dermique du saumon), Gammaretrovirus (MMLV : virus de leucémie murine de Moloney ; FeLV : virus de la leucose féline ; GALV : virus de la leucémie du gibbon), Lentivirus (HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; SIV : virus de l'immunodéficience simienne ; EIAV : virus de l'anémie infectieuse des équidés ; FIV : virus de l'immunodéficience féline ; VISNA : virus Maëdi-visna ou lentivirus des ovins), Spumaretrovirus (SFV : spumavirus simien ; HFV : spumavirus humain ; EFV : spumavirus équin ; BFV : spumavirus bovin ; FFV : spumavirus félin). Les genres avec des virus complexes sont surlignés en gras.



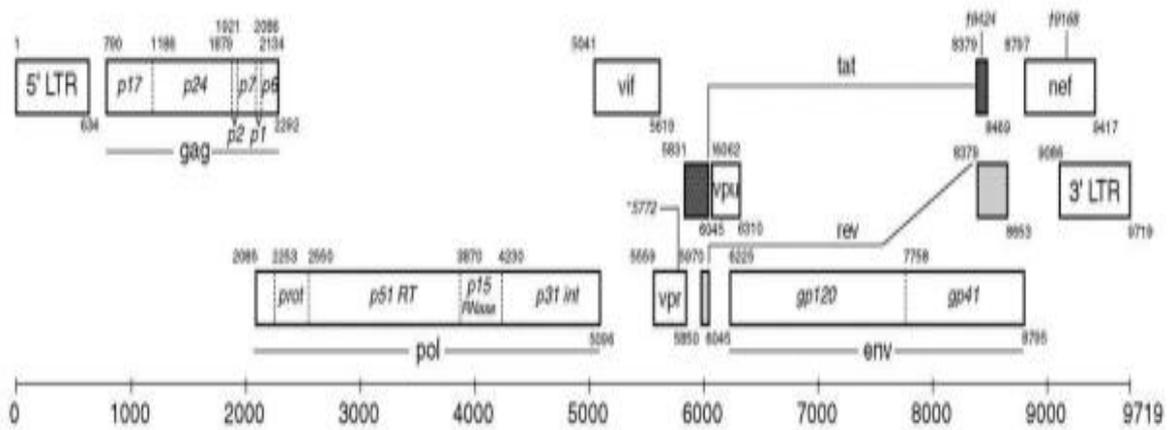
**Figure 2 : Structure du VIH dessiné à la main à partir des données de biologie structurale, de biophysique et de microscopie (modifiée d'après Goodsell et al., 2015).**

Le génome ARN du VIH est représenté en jaune pâle. Les protéines structurales sont colorées en bleu, ainsi que les glycoprotéines d'enveloppes. Les protéines enzymatiques sont colorées en violet, avec la transcriptase inverse (RT), qui synthétise l'ADNc (rouge) à partir de l'ARN viral. Les protéines accessoires sont colorées en vert. Enfin, les protéines colorées en orange représentent les protéines encapsidées avec l'ARN viral : les protéines régulatrices Tat et Rev (en orange foncé), ainsi que la protéine de la nucléocapside (en orange pâle).

### 1.2.2. Organisation génétique du VIH :

Le génome du VIH mesure environ 10 000 paires de base (pb) et il est composé de 9 cadres ouverts de lectures (Figure 3). 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) (Krebs et al., 2013), 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.

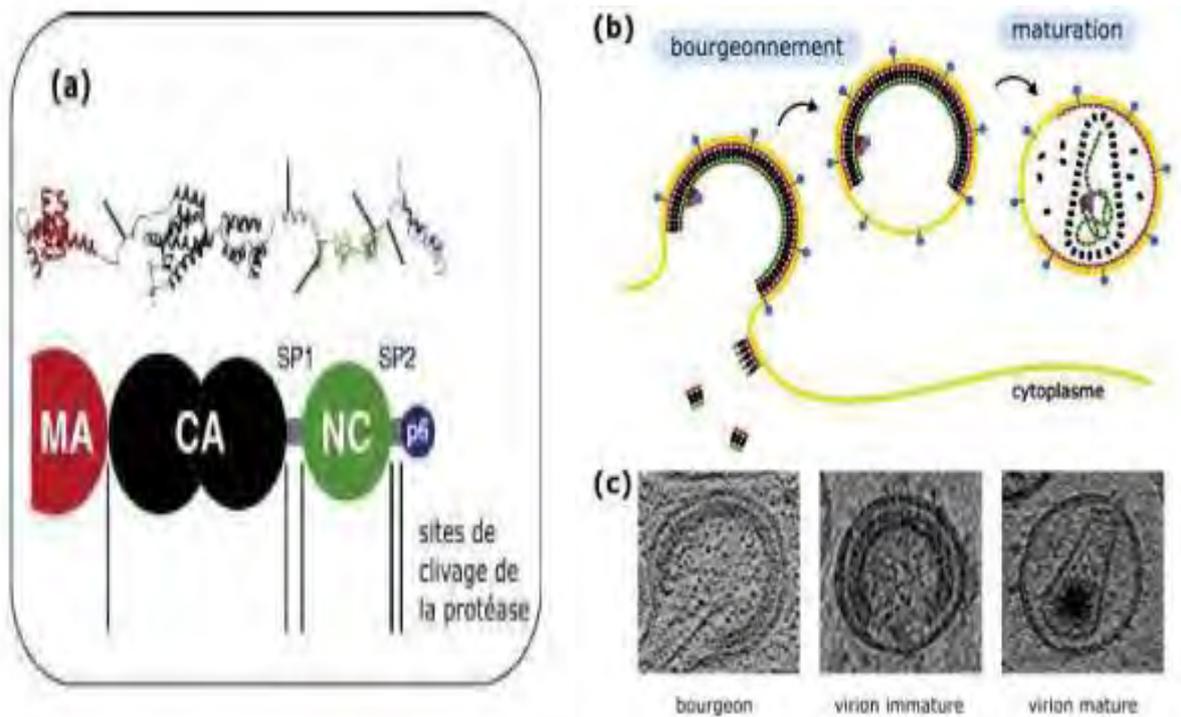
Le LTR en 5' sert de promoteur pour la transcription virale tandis que le LTR en 3' sert de signal de fin transcriptionnel. LTR en 3' active aussi la transcription de *nef*.



**Figure 3 : Structure génomique de la souche de référence du VIH-1 (HXB2, numéro d'accèsion GenBank K03455).**

**1.2.2.1. 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 (p1, MA), protéine de capsid (p24, CA), peptide d'espace SP1, protéine de nucléocapsid (p7, NC), peptide d'espace SP2, et protéine p6 résultante du clivage (Figure 4). 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 plasmique 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 capsid. 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).



**Figure 4 : Assemblage et maturation du VIH.**

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) (Wilén et al., 2012). Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont donc impliquées dans l'attachement, la fusion et la cytolysse au cours de l'entrée du virus dans la cellule.

### 1.2.2.2. 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 capsid, 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.

### 1.2.3. Cycle de réplication virale :

Les principales cellules cibles du VIH sont celles qui présentent à leur surface la glycoprotéine CD4 : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (CD4) majoritairement, mais aussi les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, ainsi que les cellules de la microglie cérébrale (Dalglish et al., 1984). La réplication a donc lieu dans les organes lymphoïdes, principalement les ganglions lymphatiques, mais aussi dans l'intestin au niveau du GALT (tissu lymphoïde associé au tube digestif, gut associated lymphoid tissue en anglais), dans la rate et le thymus, ainsi qu'au niveau du cerveau. Elle a également lieu dans les liquides biologiques (sang, sécrétions génitales, lait, liquide broncho-alvéolaire...).

Le cycle de réplication du VIH débute par la phase précoce, qui comprend : l'entrée du virus dans la cellule cible, puis la transcription de l'ARN viral génomique en ADN, en vue d'être intégré dans le génome de la cellule cible (Figure 5). Ensuite, la phase tardive est dépendante de l'état d'activation de la cellule infectée. Tandis que les cellules en état de latence représentent les réservoirs cellulaires de l'infection, les cellules activées réaliseront : la transcription de l'ADN proviral, la traduction des protéines virales, l'assemblage, le bourgeonnement et enfin, la maturation du virus. De cette façon, environ 10<sup>9</sup> à 10<sup>10</sup> virus sont produits chaque jour chez une personne infectée non traitée (Geretti, 2006).

Les molécules antirétrovirales actuellement disponibles bloquent une des différentes étapes du cycle de réplication du virus : entrée, transcription inverse, intégration ou la maturation.

### 1.2.3.1. Phase précoce :

Pour entrer dans la cellule hôte, la gp120 (au niveau de sa boucle V1) du VIH doit d'abord reconnaître spécifiquement le récepteur CD4 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Figure 5) (Wilensky et al., 2012). Grâce à cette liaison de haute affinité, la gp120 va subir un changement conformationnel qui va lui permettre de se lier (au niveau de sa boucle V3) à l'un des deux co-récepteurs aux chimiokines, CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, en anglais) ou CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4, en anglais) (Feng et al., 1996). Cette nouvelle liaison engendre également un changement conformationnel de la gp41 du VIH, qui lui permet d'entrer en contact avec la membrane cellulaire et de réaliser la fusion de l'enveloppe virale avec celle des lymphocytes T CD4.

Dans le cytoplasme, la transcription inverse a lieu simultanément avec la décapsidation du virus. Elle est réalisée grâce aux trois activités enzymatiques distinctes que possède la RT : 1) polymérisation d'ADNc à partir de l'ARN viral pour former un hybride ARN/ADNc, 2) dégradation de l'ARN viral par la ribonucléase H (RNase H), et 3) polymérisation d'ADN à partir de l'ADN viral néo-synthétisé pour former un double brin d'ADN viral (Telesnitsky and Goff, 1999). Le double brin d'ADN viral va ensuite former le complexe nucléoprotéique CPI, qui sera transféré activement vers le noyau, notamment grâce à Vpr (Bowerman et al., 1989).

L'intégration de l'ADN proviral sera alors réalisée par l'intégrase (IN), qui clivera d'abord les extrémités 3'-LTRs de l'ADN, puis insérera de façon stable l'ADN viral en ligant ces LTRs au génome cellulaire (Craigie, 2012). Cette étape étant complexe, dans un certain nombre de cas, l'ADN reste sous forme non intégrée : soit linéaire où il se dégrade, soit sous forme circulaire avec un ou deux LTRs (Figure 5). Une fois intégré, le provirus peut rester latent pendant de longues périodes, constituant ce qu'on appelle des « réservoirs ». Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos (CD4 mémoires) représentent les principales cellules réservoirs du VIH.

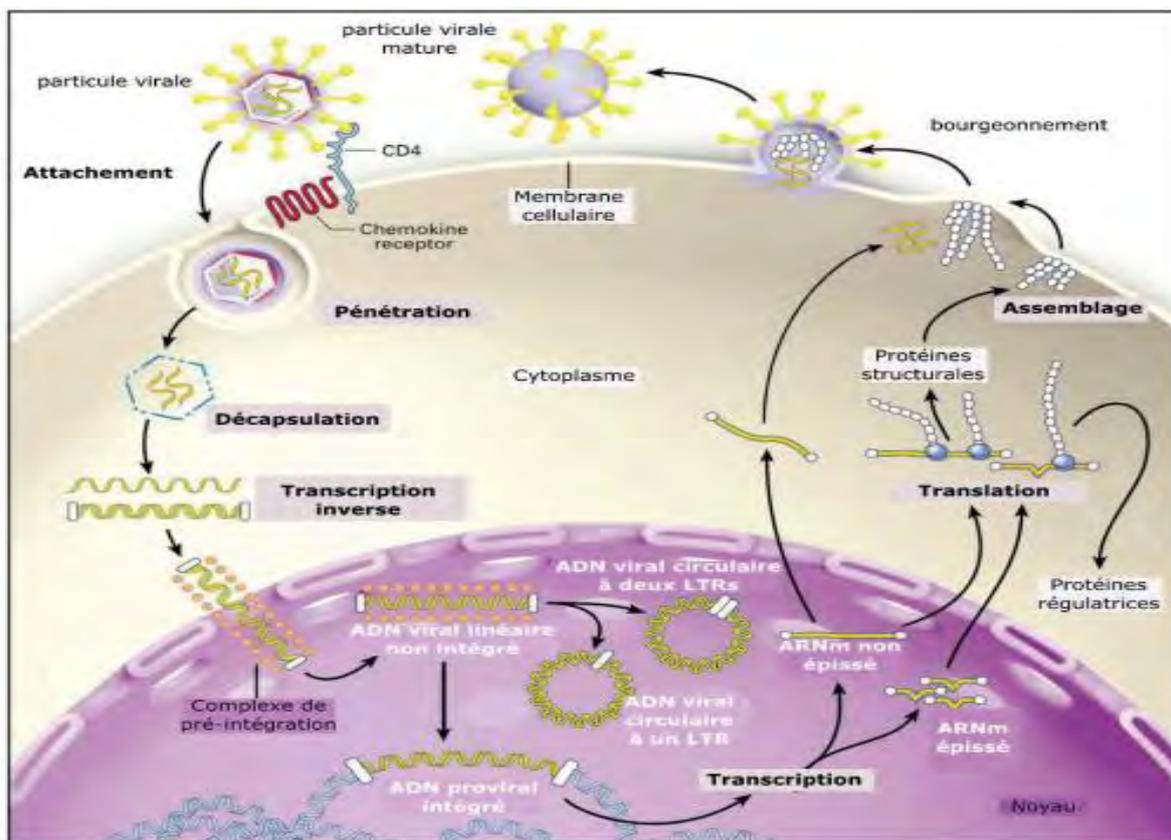


Figure 5 : Schéma des étapes du cycle de réplication viral montrant les différentes formes d'acides nucléiques du VIH présentes dans la cellule infectée (modifié de Pasternak et al., 2013).

### 1.2.3.2. Phase tardive :

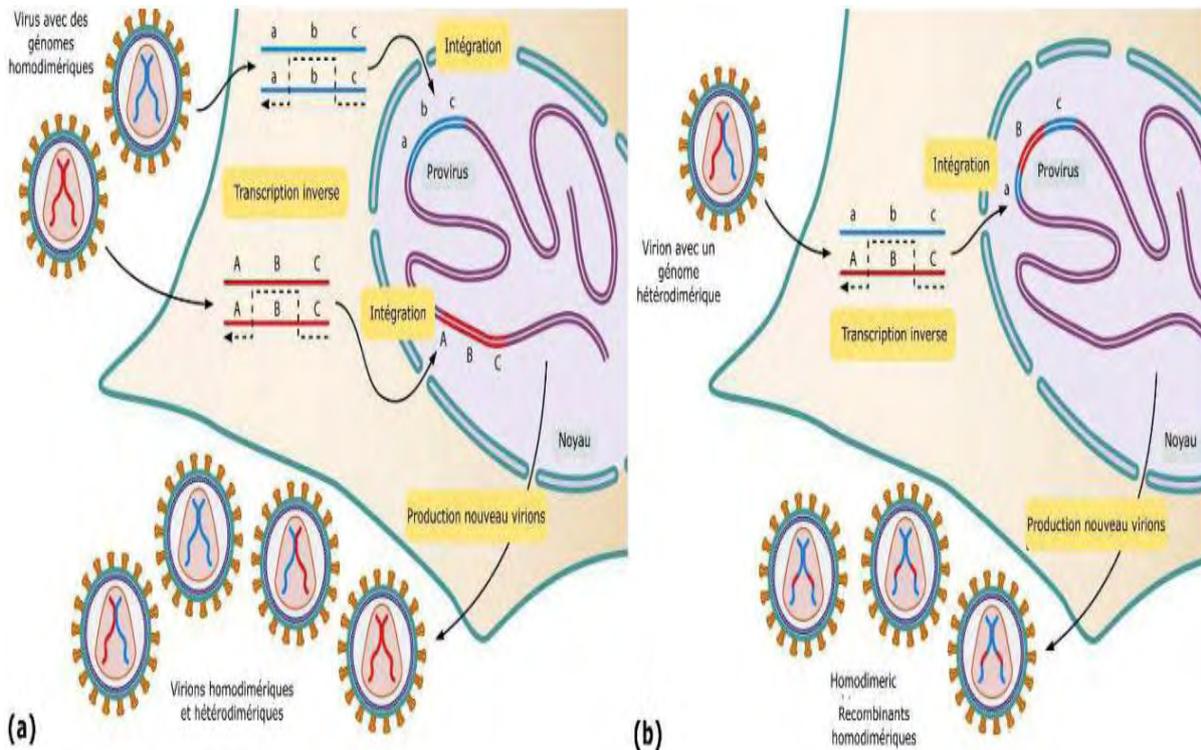
De façon simple, le provirus utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer : l'ADN proviral est transcrit en ARN par la polymérase II cellulaire, sous l'action activatrice de Tat. A l'issue d'un épissage alternatif, l'ARNm est transporté du noyau vers le cytoplasme, grâce à Rev. A partir de l'ARN épissé, les protéines régulatrices Tat et Rev sont les premières à être traduites, car elles jouent un rôle essentiel dans la transcription et la traduction des précurseurs polyprotéiques Pr55 Gag et Pr160 Gag-Pol (à partir de l'ARN non épissé), des glycoprotéines d'enveloppes et des protéines accessoires. Pr55 Gag s'assemble au niveau de la membrane plasmatique cellulaire pour former un bourgeon. Après scission, le virion immature est libéré dans le milieu extracellulaire et subit la protéolyse, qui aboutit à la formation d'un virus mature (Figures 4 et 5).

### 1.2.3.3. Origine de la diversité génétique et recombinaisons du VIH :

La RT est une enzyme peu fidèle car elle est dépourvue de l'activité exonucléasique 3'-5', qui permet de corriger les erreurs de transcription (Roberts et al., 1988). Ainsi, on estime que l'activité de la RT induit un taux de mutation de  $3,4 \text{ à } 10 \times 10^{-5}$  mutations par paire de base

(pb) et par cycle de réplication. La taille du génome étant d'environ  $10^4$  pb, on estime finalement que le taux de mutations varie entre 0,34 et 1 mutation par génome et par cycle de réplication (Geretti, 2006). Les insertions et les délétions au sein du génome viral sont également fréquentes. De plus, le VIH possède un taux de réplication virale élevé : environ  $10^9$  à  $10^{10}$  de virus sont produits chaque jour chez une personne infectée non traitée (Geretti, 2006).

L'association de ces deux facteurs, erreur de transcription et réplication élevée, génère rapidement de nombreux variants minoritaires, qui sont génétiquement différents tout en restant extrêmement proches. Egalement appelés « quasi-espèces », ils sont à l'origine d'une variabilité génétique intra-individuelle (Hemelaar, 2012). Ainsi, on estime que les séquences nucléotidiques virales peuvent différer jusqu'à 10% au sein d'un même individu. Cette caractéristique enzymatique contribue fortement à la diversité génétique du VIH et à l'émergence des résistances, en présence d'une pression de sélection immunitaire et antirétrovirale.



**Figure 6 : Mécanisme de formation d'un virus recombinant (modifié d'après Onafuwana and Telesnitsky, 2009).**

Au cours de la transcription inverse, la RT change aussi fréquemment de matrice. En cas de co-infection, ou plus souvent de superinfection (ré-infection), par au moins deux souches virales génétiquement différentes, il est possible que cela génère des virus recombinants qui sont obtenus après deux cycles de recombinaison successifs (Figure 6). La recombinaison est un processus au cours duquel le virion néoformé possède un matériel génétique issu de l'échange de matériel de deux virus parentaux. Ce mécanisme peut concerner des sous-types ou des groupes différents (M et O par exemple), et même des virus déjà recombinants (Robertson et al., 1995).

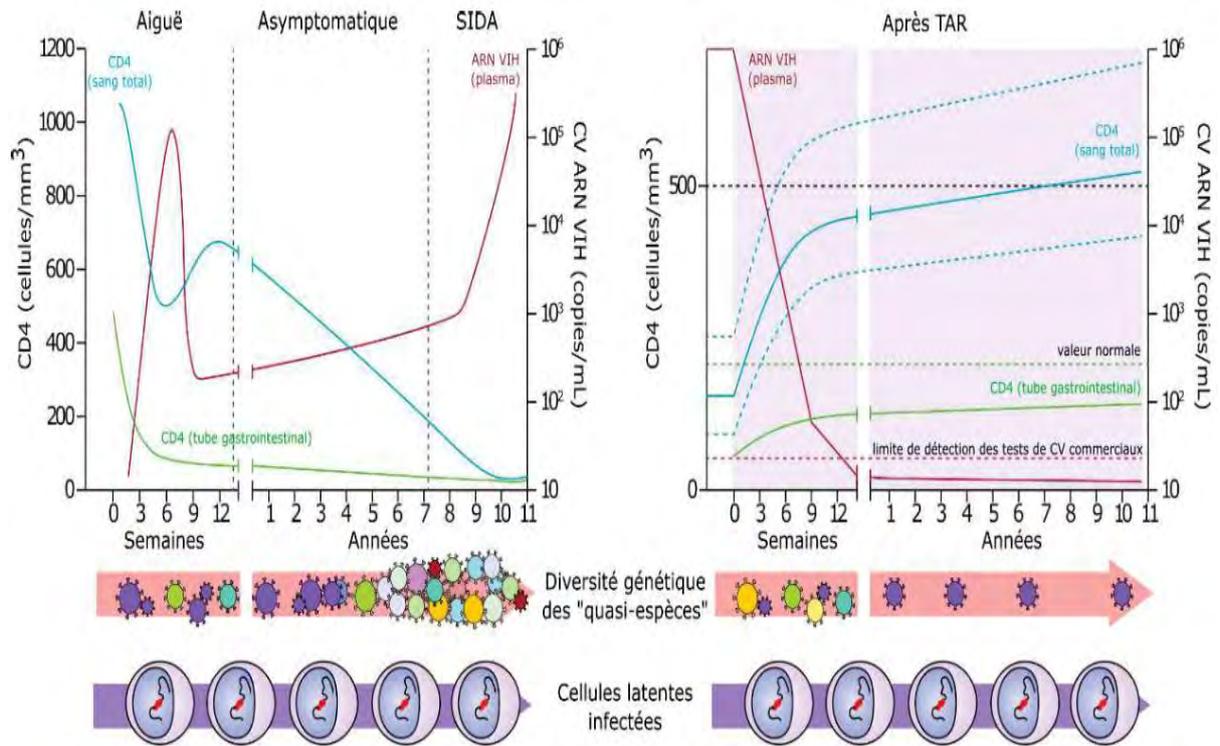
#### **1.2.4. L'histoire naturelle de l'infection à VIH/SIDA :**

Le VIH se transmet de façon horizontale par voie sexuelle (sperme, sécrétions vaginales) et sanguine (ex. Transfusion ou partage de seringues contaminées) ; et de façon verticale de la mère à l'enfant, au cours de la grossesse, l'accouchement ou de l'allaitement.

Schématiquement, plus la charge virale est élevée dans le liquide contaminant, plus le risque de transmission est important. Inversement, l'indétectabilité du virus réduit fortement sa transmission, sans l'empêcher complètement.

##### **1.2.4.1. Phase de primo-infection :**

La phase de primo-infection correspond aux premières semaines qui suivent l'entrée du virus dans l'organisme (Figure ). Dans les cas les plus communs de transmission sexuelle, le VIH traverse l'épithélium de la muqueuse génitale ou rectale en quelques heures. De façon paradoxale, la mise en place de la réponse immunitaire va fournir au virus les cellules cibles lui permettant sa réplication au niveau local. Ainsi, le VIH va se multiplier intensivement dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés qui affluent, produisant environ 10<sup>9</sup> à 10<sup>10</sup> virus par jour, et détruisant une quantité à peu près équivalente de lymphocytes T CD4. Cette déplétion massive et précoce en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> concerne surtout les compartiments muqueux, et principalement le GALT de la muqueuse intestinale. Pendant cette phase qui est dite « d'éclipse » et qui dure une dizaine de jours, la charge virale (CV) plasmatique est indétectable (Coffin and Swanstrom, 2013).



**Figure 7 : Evolution 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) (modifié d'après Maartens et al., 2014).**

Deux à six semaines après la contamination, le virus va migrer vers les ganglions lymphatiques, puis disséminer vers les organes lymphoïdes. Cela se traduit par une augmentation très rapide de la CV plasmatique, pouvant aller jusqu'à 10<sup>7</sup> copies/ml, et une diminution transitoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sanguins. A ce moment, la présence de l'antigène viral p24 est détectable avec un test ELISA de quatrième génération, avant que les anticorps soient déjà présents. Cette phase dite « aiguë » de l'infection, s'accompagne dans 50 à 60% des cas de manifestations cliniques non spécifiques, correspondant généralement à un syndrome pseudo-grippal. A la fin de cette phase, du fait de la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire et de l'épuisement des cellules cibles activées, on observe une chute considérable de la virémie (< 1 000 copies/ml) et inversement, le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> augmente.

Les réservoirs viraux sont constitués dès la primo-infection, avec l'intégration du virus dans le génome des cellules hôtes.

#### **1.2.4.2. Phase de latence clinique ou asymptomatique :**

Environ 12 semaines après l'infection, la mise en place de la réponse immune cellulaire provoque l'entrée dans la phase de latence clinique, souvent asymptomatique et pouvant durer entre 2 et 12 ans. Les anticorps anti-VIH apparaissent généralement dans la circulation sanguine entre la 3<sup>ème</sup> semaine et la 12<sup>ème</sup> semaine après l'infection. Pendant cette phase, la réplication virale est inhibée par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CD8) qui détruisent les cellules cibles infectées, et les anticorps anti-VIH qui limitent la fixation du VIH aux CD4. Cette phase est caractérisée par une augmentation constante ou légèrement progressive de la CV plasmatique, généralement de  $< 1\ 000$  à  $> 100\ 000$  copies/ml. (Coffin and Swanstrom, 2013).

La valeur de CD4 initialement stable, voire proche de la normale ( $\sim 1000$  cellules/mm<sup>3</sup>) va progressivement diminuer (environ 50-100 cellules/mm<sup>3</sup> par an). Ils sont continuellement renouvelés jusqu'à l'altération des organes lymphoïdes, rompant ainsi l'équilibre précaire qui s'était créé entre la réplication virale et la réponse immunitaire.

#### **1.2.4.3 Phase symptomatique aboutissant au SIDA :**

Ce stade correspond à l'augmentation de la CV plasmatique et à l'effondrement du système immunitaire ( $CD4 < 200$  cellules/mm<sup>3</sup>). L'infection symptomatique est caractérisée par des maladies opportunistes mineures (candidose orale) ou majeures (pneumocystose, toxoplasmose, tuberculose, CMV...). Elle peut aussi entraîner des maladies tumorales (sarcome de Kaposi lié à HHV-8, lymphome B lié à EBV), ainsi que des encéphalopathies à VIH.

L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a élaboré une classification clinique en 4 stades de l'infection à VIH (stade 1 pour asymptomatique, puis stades 2, 3 et 4 en fonction de la gravité des maladies). En l'absence de traitement antirétroviral (TAR), l'évolution naturelle de l'infection à VIH aboutit au décès de quasiment tous les patients, en moyenne 8 à 10 ans après la primo-infection. Occasionnellement ( $< 1\%$ ), certains patients appelés « contrôleurs du VIH » (elite controllers en anglais) arrivent à contrôler l'infection en l'absence de TAR sur une très longue période : ils contrôlent naturellement la réplication du virus et maintiennent un niveau de CD4 élevé (Cao et al., 1995; Lambotte et al., 2005).

### **1.3. Origine et classification du VIH:**

#### **1.3. 1. Origine 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 des événements de transmission indépendante précoce au 21<sup>ème</sup> siècle ont engendré différents groupes de VIH-1 : major (M, entre 1915 et 1941), outlier (O), Non-majeur et Non-outlier (N) et P. 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, 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 Zaïre 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).

Il est clair que l'histoire naturelle de l'infection à VIH-2 diffère considérablement de celle du VIH1, ce qui n'est pas surprenant étant donné que le VIH-2 provient de très différents lentivirus des primates. 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 les humains en Afrique de l'Est hébergent les souches de VIH-2 qui ressemblait à l'infection locale à SIVsmm circulant.

#### **1.3.2. Classification du VIH :**

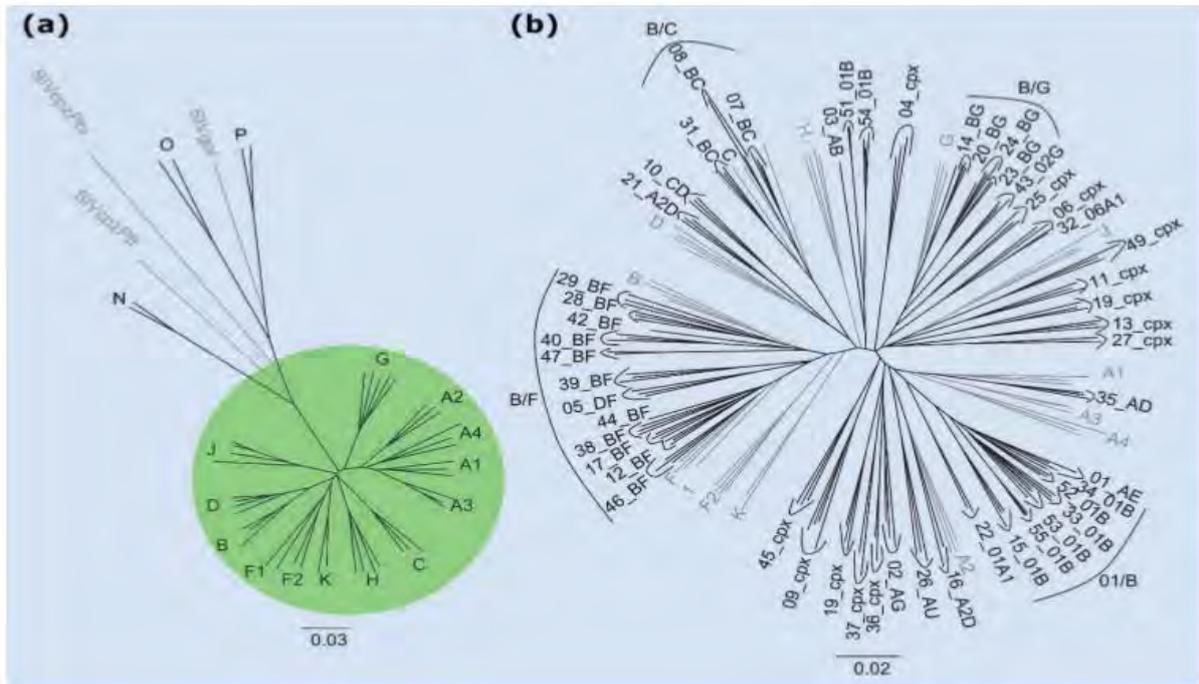
La base de la classification du VIH repose d'abord sur la diversité génétique liée à ses différentes origines simiennes (SIVgor/SIVcpz et SIVsmm), comme nous venons de l'évoquer.

Il est ainsi constitué de deux types de virus : le VIH-1 et le VIH-2.

##### **1.3.2.1. VIH-1 : 4 groupes (M, N, O et P), 9 sous-types (A-K) et presque 100 CRFs.**

Le VIH-1 est divisé en 4 groupes : **M** pour « Majeur », **N** pour « non-M/non-O », **O** pour « Outlier », et **P** (Figure 8) (Barré-Sinoussi et al., 1983; De Leys et al., 1990; Plantier et al., 2009; Robertson et al., 2000; Simon et al., 1998).

Au sein de l'hôte, les taux élevés de mutations et de recombinaisons sont aussi à l'origine de la diversité génétique du VIH, qui est soumise à la pressions de sélection de la réponse immunitaire et de plus en plus aujourd'hui à celle du traitement antirétroviral (TAR). Actuellement, le VIH-1 M est divisé en neuf sous-types (A-D, F-H, J et K) ainsi qu'en sous-sous-types pour le VIH-1 A (A1-A4) et le VIH-1 F (F1 et F2) (Figure 8). Actuellement, presque 100 CRFs ont été identifiés dans le monde .



**Figure 8 : Phylogénie représentant la large diversité des souches issues de la lignée VIH-1/SIVcpz/SIVgor (modifié d’après Peeters et al., 2013).**

### 1.3.2.2. VIH-2 : 9 groupes (A-I).

Le VIH-2 est composé de neuf groupes : A, B, C, D, E, F, G, H et I (Ayouba et al., 2013; Damond et al., 2004). Le VIH-2 circule principalement dans les pays d’Afrique de l’Ouest où entre 1 et 2 millions de patients étaient infectés dans les années 1990 (Visseaux et al., 2016b). L’épidémie est représentée par le groupe A (Guinée-Bissau et Sénégal) et le groupe B (Côte d’Ivoire).

## **2. Traitement antirétroviral:**

### **2.1. Généralités, principes actuels du traitement antirétroviral:**

La connaissance du cycle de réplication du VIH a permis de fournir de nombreuses cibles pour le développement d'agents antirétroviraux. 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 "Highly Active Antiretroviral Therapy" ont montré une efficacité considérable.

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.

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. Les recommandations françaises actuelles préconisent une charge virale < 50 copies/ml sous traitement antirétroviral.

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).

**Tableau I: Schémas thérapeutiques recommandés par l’OMS dans les pays du Sud en 2016.**

POPULATION	SCHEMA DE 1 <sup>ÈRE</sup> INTENTION	SCHEMA DE 2 <sup>ÈME</sup> INTENTION	SCHEMA DE 3 <sup>ÈME</sup> INTENTION
Adultes et adolescents	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1-2 INTI
		2 INTI + DRV/r	
	2 INTI + DTG	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + INTI ± INNTI
		2 INTI + DRV/r	Optimisation du schéma thérapeutique à l'aide du profil génotypique
Femmes enceintes/ allaitant au sein	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1-2 INTI
		2 INTI + DRV/r	
Enfants	2 INTI + LPV/r	Si âgé de moins de 3 ans: 2 INTI + RAL	DTG + 2 INTI
		Si âgé de plus de 3 ans: 2 INTI + EFV ou RAL	DRV/r + 2 INTI DRV/r + DTG ± 1-2 INTI
	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	

## 2.2. Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs) :

Première classe mise sur le marché (198 ), les INTIs demeurent au cœur des combinaisons d'ARV. Les molécules appartenant à cette famille agissent par inhibition de la transcriptase inverse. Tous les INTIs peuvent être considérés comme des pro-drogues car ils subissent une triphosphorylation intracellulaire pour être actifs sur la transcriptase inverse. Ils sont alors incorporés dans le premier brin d'ADN proviral, en compétition avec les nucléosides naturels et conduisent à l'arrêt de la synthèse d'ADN viral. En effet, ce sont des analogues des nucléosides naturels, mais privés d'un groupement hydroxyle en 3' (didésoynucléosides ou ddNTP) et donc incapables d'assurer la liaison 5'-3' avec le nucléoside suivant. Ils sont ainsi appelés « terminateurs de chaîne ».

**Tableau II: Caractéristiques des principales INTIs.**

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

### **2.3. 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<sup>ère</sup> 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 Ripvirine (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 structure chimique différente des INTIs, les INNTIs sont des inhibiteurs puissants et très sélectifs de la TI du VIH ; ils sont inactifs sur le VIH-2 et ne sont pas utilisés non plus sur le VIH-1 groupe O. Cependant l'ETR présente une activité in vitro contre le groupe O. A la différence des analogues nucléosidiques, ils inhibent la TI de façon non compétitive, en se fixant directement au niveau d'une poche hydrophobe à proximité du site catalytique de l'enzyme. Pour être actifs, ils ne nécessitent pas de modification chimique. Ils sont métabolisés quasi exclusivement par le foie avec une demi-vie longue, permettant une prise unique journalière, et sont donc utilisables dans les associations à prise unique journalière.

**Tableau III: Principales caractéristiques des INNTIs.**

DCI	Névirapine	Efavirenz	Etravirine	Rilpivirine
Spécialité	Viramune <sup>®</sup>	Sustiva <sup>®</sup>	Intérence <sup>®</sup>	Edurant <sup>®</sup>
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 Hépto-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

#### 2.4. Inhibiteurs de la protéase (IPs) :

L'arrivée de cette classe d'ARV en 1996 a révolutionné la prise en charge des malades. Les IPs agissent en inhibant la protéase dont le rôle est de cliver les précurseurs des protéines virales pour les rendre fonctionnelles (polyprotéines Gag et Gag-Pol). 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. Les nouveaux virus seront immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules. Ils sont actifs sur les VIH-1 et 2. Les IPs potentialisés ont une barrière génétique plus élevée que les INNTIs et n'entraînent que rarement des résistances précoces, même en cas d'observance imparfaite. Ils sont tous métabolisés au niveau hépatique par les cytochromes P450, particulièrement par le CYP3A, et de nombreuses interactions médicamenteuses sont à prendre en compte. Leurs principaux effets indésirables de classe sont les dyslipidémies, notamment lors de l'utilisation du LPV/r (KALETRA®). Les anciennes molécules étaient responsables de lipodystrophies.

L'utilisation d'un IP s'effectue potentialisée (« boostée ») par l'addition d'une faible dose de ritonavir (r), qui confère une efficacité renforcée (important effet inhibiteur du CYP3A par le ritonavir) mais rendant parfois souhaitable le contrôle des concentrations plasmatiques résiduelles, notamment pour surveiller un éventuel surdosage. L'atazanavir (ATV, REYATAZ®) peut échapper à cette règle et être parfois utilisé sans ritonavir.

Pour conclure, si on choisit un IP/r comme 3<sup>e</sup> agent d'une trithérapie en première intention, il est actuellement recommandé d'utiliser préférentiellement l'ATV/r ou le DRV/r.

**Tableau IV: Caractéristiques des principales IPs.**

DCI	Ritonavir	Tipranavir	Atazanavir	Lopinavir/ r	Darunavir
Spécialité	Norvir <sup>®</sup>	Aptivus <sup>®</sup>	Reyataz <sup>®</sup>	Kaletra <sup>®</sup>	Prezista <sup>®</sup>
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 Dysgueusies 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

## 2.5. 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®), apparu sur le marché en 2003, est un polypeptide synthétique dont la séquence correspond à la région HR2 de la gp41 qui se fixe sur la région HR1 de cette glycoprotéine. En se liant à la gp41, elle bloque la fusion virus/cellule par inhibition compétitive. Elle n'est pas active sur le VIH de type 2. Sa barrière génétique est faible ce qui implique de ne pas l'utiliser seule.

### - Inhibiteur de CCR5 :

De la classe des inhibiteurs du corécepteur CCR5, 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. Il bénéficie d'une bonne tolérance. 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.

## 2.6. 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 Dolutégravir (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.

Le DTG présente une barrière génétique plus élevée que le RAL ou l'EVG. Il est administré en une fois par jour et n'a pas besoin d'être potentialisé.

Ces trois inhibiteurs sélectifs du transfert de l'ADN viral peuvent désormais faire partie de la 1<sup>ère</sup> ligne thérapeutique.

**Tableau V:** Caractéristiques des INIs.

DCI	Raltégravir	Elvitégravir	Dolutégravir
Spécialité	Isentress <sup>®</sup>	Dans l'association Stribild <sup>®</sup>	Tivicay <sup>®</sup>
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

### 3. Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales:

#### 3.1. Origine et sélection de la résistance :

##### 3.1.1. Principes :

La résistance du VIH peut être définie comme la capacité du virus à se répliquer en présence d'une ou plusieurs molécules ARVs à des concentrations inhibant la réplication d'un virus sauvage sensible. Elle provient de la variabilité génétique intra-individuelle du VIH-1 s'expliquant à la fois par : le taux élevé de réplication du VIH-1 (jusqu'à  $10^{10}$  virus par jour, chez un patient non traité), son taux élevé de mutations (~ 1 mutation nucléotidique par cycle viral) ; ainsi que par des recombinaisons fréquentes (Geretti, 2006; Hemelaar, 2012; Ho et al., 1995; Meyer et al., 1999). Les mutations sont générées par la RT qui est dépourvue d'activité correctrice exonucléasique 3'-5' (Roberts et al., 1988).

Les mutations surviennent donc de façon aléatoire et la plupart du temps, elles sont délétères pour le virus. Toutefois, certaines d'entre elles sont viables et vont générer des variants minoritaires, appelés aussi « quasi-espèces » (~ 10% de la population virale totale). Parmi ces variants, peuvent se trouver des souches résistantes aux ARVs, qui

possèdent une ou plusieurs mutations au niveau du gène *pol*, codant généralement pour les cibles thérapeutiques principales de la protéase (PR), la région polymérase de la transcriptase inverse (RT), et de l'intégrase (II).

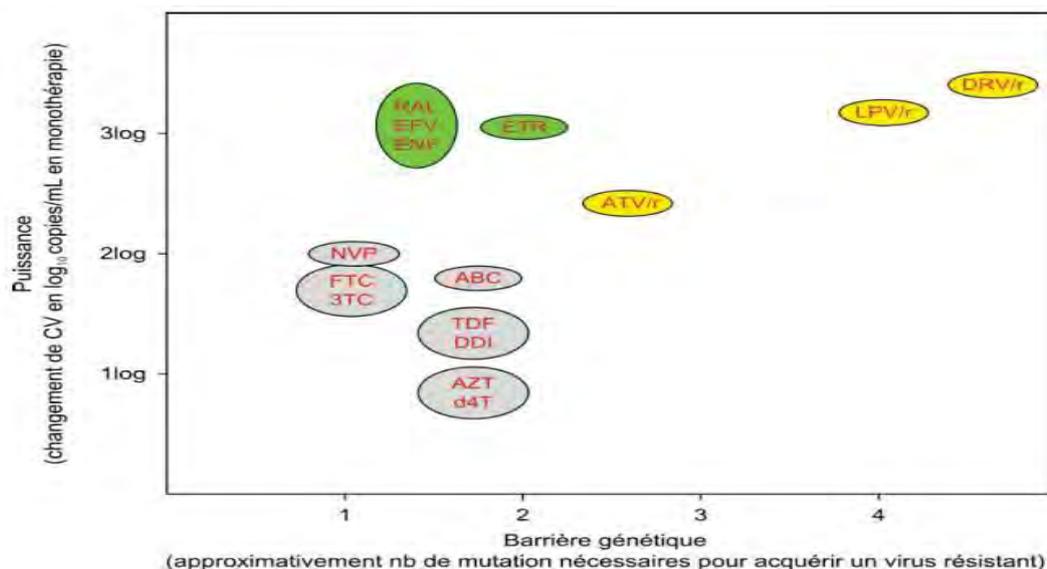
En présence d'un TAR, les mutations associées à la résistance aux ARVs (mutations de résistance, pour simplifier) apportent un avantage réplcatif plus ou moins important aux variants minoritaires correspondants. Ces derniers étant moins inhibés par le TAR, ils vont pouvoir se répliquer et émerger jusqu'à devenir à leur tour majoritaires.

### 3.1.2. Déterminants de la résistance du VIH-1 aux ARVs :

Les facteurs contribuant à la sélection de mutations associées à la résistance du VIH-1 aux ARVs (mutations de résistance, pour simplifier) peuvent être regroupés dans les 4 catégories suivantes : (1) TAR, (2) virus, (3) patient (hôte), et (4) environnement.

Même si un seul facteur suffit parfois (ex. inobservance du TAR), la sélection des mutations de résistance peut-être aussi multi-factorielle.

- (1) **Facteurs liés au TAR :** la notion barrière génétique s'applique aux molécules du TAR. Elle correspond à leur capacité à ne pas sélectionner des souches résistantes lorsqu'une faible virémie persiste. En pratique, elle dépend de plusieurs conditions : (1) nombre et type (transition < transversion) de changements nucléotidiques nécessaires pour obtenir une mutation de résistance, (2) impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'ARV, (3) impact de cette mutation sur la capacité de réplcation virale.



**Figure 9 : Schéma de la barrière génétique et de la puissance des principaux ARVs couramment utilisés (modifié d'après Tang et Shafer, 2012).**

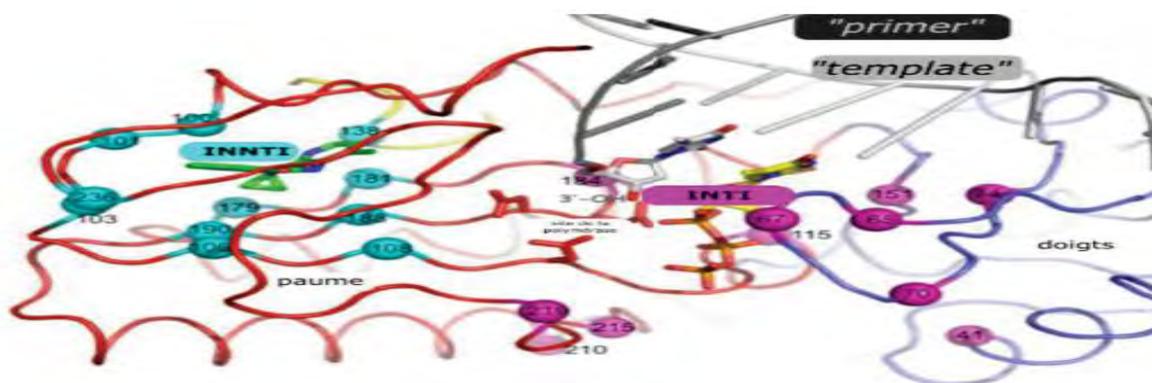
- (2) **Facteurs liés au virus** : la fréquence et les caractéristiques des profils de mutations peuvent quelque fois varier en fonction des sous-types viraux. C'est le cas par exemple du VIH-1 C qui a une barrière génétique plus faible pour acquérir la V106M en présence d'INNTIs. En effet, le nombre de changements nucléotidiques nécessaire pour acquérir la V106M est égale à un pour le VIH-1 C (GTG → ATG), alors qu'il est de deux pour les VIH-1 B (GTA → ATG) (van de Vijver et al., 2006). De même, la mutation K65R émerge plus rapidement avec le VIH-1 C, en présence de d4T/TDF, du fait d'un polymorphisme unique autour de cette position qui est à l'origine d'un mécanisme de « pausing » au cours de la synthèse d'ADN (Figure 20) (Brenner et al., 2006; Coutsinos et al., 2009).

(3 et 4) **Facteurs liés à l'hôte (patient) et à l'environnement** : l'inobservance au TAR est un facteur majeur associé à la sélection de résistance puisqu'il engendre aussi une concentration sous-optimale d'ARVs. Dans les pays du Sud, ce phénomène est fortement associé aux facteurs programmatiques. De plus, une mauvaise absorption du TAR et la variabilité inter-individuelle du métabolisme hépatique peuvent aussi être à l'origine de concentrations sous-optimales d'ARVs.

### 3.2. Résistance aux INTIs :

#### (1) Mutations « discriminantes » des INTIs

Les INTIs ne bloquent pas l'activité de la RT mais s'incorporent en tant que « terminateurs de chaîne » au cours de la polymérisation de l'ADN viral, comme nous l'avons brièvement expliqué (partie 2.2). Le premier mécanisme de résistance aux INTIs implique des mutations qui diminuent leur taux d'incorporation ( $k_{pol}$ ) au profit des dNTPs naturels, entraînant ainsi une augmentation de la réplication virale. Cette « voie discriminatoire » est principalement représentée par les mutations M184V/I et K65R, ainsi que les mutations K70E, L74V, Y115F, et le « complexe Q151M » (Figure 10) (Wensing et al., 2015).



- **La mutation M184VI** est sélectionnée par 3TC/FTC auxquels elle confère une forte résistance, en réduisant par plus de 100 fois leur sensibilité, en comparaison à une souche sauvage (Frost et al., 2000). Elle peut aussi diminuer la sensibilité à ABC et ddI lorsqu'elle est associée à d'autres mutations, générant ainsi des résistances croisées. Inversement, elle augmente la sensibilité au TDF et AZT/d4T, ce qui justifie le choix de conserver 3TC/FTC malgré la présence de virus porteurs de M184VI lorsqu'ils sont associés à TDF ou AZT, dans le TAR de 2<sup>ème</sup> ligne dans les pays du Sud (Gallant., 2006 ; WHO., 2016a).
- **La mutation K65R** est généralement sélectionnée par TDF, ainsi que par ABC, d4T et ddI, réduisant par 2 fois environ leur sensibilité (Garforth et al., 2014; Tang et al., 2013; Wensing et al., 2015). De plus, elle réduit d'environ 5 à 10 fois la sensibilité de 3TC/FTC. A l'inverse, elle augmente la sensibilité à l'AZT. La K65R est généralement sélectionnée plus rapidement chez les patients infectés par le VIH-1 C (Garforth et al., 2014; Villabona-Arenas et al., 2016).

## **(2) Mutation de « déblocage » de l'élongation ou mutations des analogues de la thymidine (TAMs)**

L'autre mécanisme de résistance aux INTIs implique des mutations qui modifient la structure de la RT et favorisent l'excision nucléotidique de certains INTIs, en inversant le sens de la réaction de polymérisation (Arion et al., 1998; Meyer et al., 1998, 1999). Cette réaction de pyrophospholise utilise comme co-substrats l'ATP (adénosine triphosphate), ou plus rarement le PPi (pyrophosphate ou diphosphate inorganique). Grâce aux mutations, ils entrent plus facilement à proximité du site des INTIs incorporées sous forme monophosphatée, en 3' de l'ADN viral. La pyrophospholise va donc libérer les INTIs sous les formes respectives de dinucléoside tétraphosphate ou de nucléoside triphosphate, et permettre ainsi la restauration de la polymérisation de l'ADN viral. En outre, la réaction d'excision peut être bloquée par la translocation des dTNP naturels et INTIs avec l'ADN en un « complexe fermé ». Comme elles sont couramment sélectionnées par AZT et d4T, ces mutations sont souvent appelées « mutations des analogues de la thymidine » (TAMs, thymidine analogue mutations en anglais).

**Les TAMs** confèrent la résistance à AZT et d4T, mais également des résistances croisées avec TDF, ABC et ddI. Classiquement, il existe huit TAMs présentes à six positions différentes sur le gène de la RT : M41L, D67N, K70R, L210W, 215Y/F et K219Q/E.

### **3.3. Résistance aux INNTIs :**

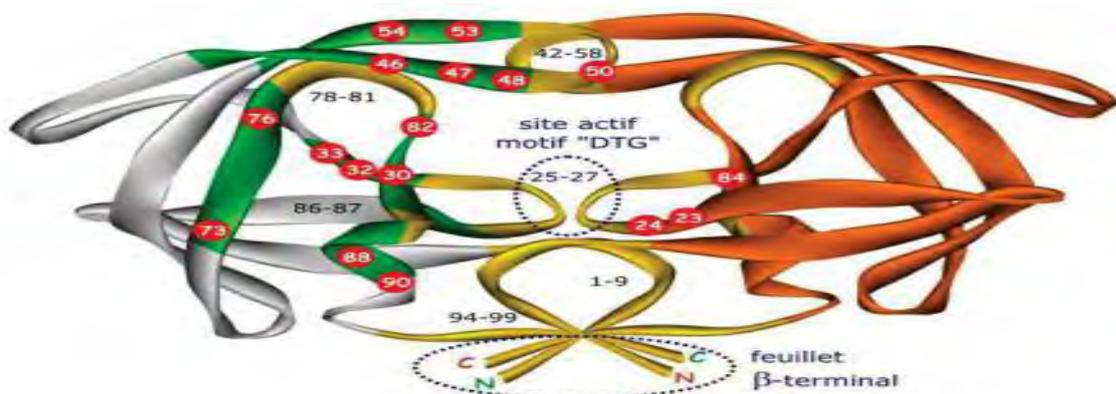
Le mécanisme de résistance aux INNTIs implique des mutations qui sont situées au niveau de leur site actif, dans la poche hydrophobe située à proximité du site de polymérisation de l'ADN (Wensing et al., 2015). Ces mutations réduisent l'affinité des INNTIs à leur site actif ou elles leur en empêchent l'accès.

- Les mutations K103NS, Y181CIV, et G190GSA sont les plus communes, ainsi que L100I, K101EP, V106AM, Y188CL et M230L. La présence d'une seule de ces mutations majeures confère généralement la résistance aux INNTIs de 1<sup>ère</sup> génération (EFV et NVP). A l'exception de K103NS et V106AM, elles réduisent aussi la sensibilité des INNTIs de 2<sup>ème</sup> génération (ETR et RPV).
- Les mutations en positions 181 et/ou 188 de la RT sont présentes chez les VIH-2 et de nombreux VIH-1 O (60%), conférant ainsi une résistance naturelle à tous les INNTIs (Ren et al., 2002; Tebit et al., 2016).

### 3.4. Résistance aux IPs :

Le mécanisme de résistance aux IPs implique généralement des mutations situées dans les régions naturellement conservées du site actif de la protéase (mutations majeures) ainsi que des mutations plus à distance (mutations accessoires) (Wensing et al., 2015).

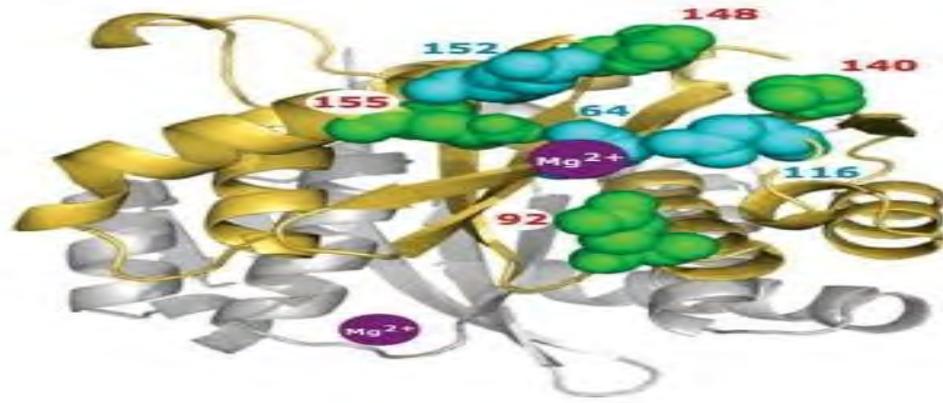
Les IPs sont des molécules à forte barrière génétique car ils nécessitent généralement d'accumuler plusieurs mutations de résistance pour voir diminuer significativement leur affinité de liaison avec le site actif de la protéase. Ainsi, la présence d'au moins 3 mutations est habituellement nécessaire pour conférer une résistance aux IPs les plus couramment utilisés (ATZ/r, LPV/r et DRV/r).



**Figure 11 : Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs.**

### 3.5. Résistance aux INIs :

Quatre positions principales de mutations majeures aux INIs de 1<sup>ère</sup> génération (RAL et EVG), situées à proximité du site actif de l'intégrase, ont été décrites : E92, G140, Q148 et N155 (Figure 12) (Menéndez-Arias, 2013; Wensing et al., 2015). Située légèrement en dehors du site actif, la position Y143 interagit aussi avec RAL.



**Figure 12 : Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs.**

La **mutation Q184HKR** réduit entre 5 et 100 fois la sensibilité de RAL/ELV si elle est seule, et de plus de 100 fois lorsqu'elle est associée avec G140SA. Cette association réduit aussi de 10 fois la sensibilité de DTG.

### 3.6. Résistance aux inhibiteurs de fusion :

- **L'enfuvirtide (T20)**, seul représentant de sa classe, possède une faible barrière génétique. En effet, en cas de réplication virale sous T20, des mutations au niveau des acides aminés 36 à 45 du domaine HR1 de la gp41 apparaissent rapidement. Cette molécule doit être associée à d'autres molécules pleinement actives pour éviter un échec virologique rapide. Il n'y a pas de résistance croisée entre le T20 et les autres inhibiteurs d'entrée que sont les inhibiteurs de CCR5.

**Tableau VI: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon l'ANRS : inhibiteurs de fusion. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>**

	Mutations associated with resistance
ENF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G36A/D/E/S/V [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]</li> <li>• V38A/E/K/M</li> </ul>
T20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q40H/K/P/T</li> <li>• N42D/T</li> <li>• N43D/H/K/S</li> <li>• L44M</li> <li>• L45Q/M</li> </ul>

ENF (T20): enfuvirtide

### 3.7. Résistance aux inhibiteurs de CCR5 :

L'émergence d'une sous-population CXCR4 minoritaire à l'instauration du traitement constitue le mécanisme principal de résistance aux inhibiteurs de CCR5. La détermination du tropisme viral est évidemment une nécessité avant toute prescription de cet ARV et en cas d'échec thérapeutique. 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.

## 4. Surveillance de la résistance:

Pour maximiser l'efficacité réelle à long terme du TAR de première intention et assurer la pérennité des programmes de TAR, il est essentiel de limiter la propagation de la résistance du VIH aux ARV. Même dans les situations où le programme de TAR est exécuté de manière optimale, il est attendu qu'un certain degré de résistance du VIH aux ARV émerge dans les populations sous TAR et que, à un certain degré, une résistance du VIH aux ARV soit transmise aux personnes qui n'étaient pas contaminées antérieurement. En conséquence, l'OMS recommande que l'extension du traitement de l'infection à VIH soit toujours accompagnée d'une évaluation rigoureuse de l'émergence et de la transmission de la résistance du VIH aux ARV.

Dans les pays du Sud, l'OMS recommande de faire la surveillance de la résistance à l'échelle nationale (WHO, 2012), selon une stratégie constituée des 5 éléments d'évaluation (Figure16) :

- (1) Suivi des indicateurs d'alerte précoce de la résistance (EWI, early warning indicators en anglais), qui évalue la mesure dans laquelle les sites fonctionnent de manière optimale pour éviter l'émergence de résistances. Il ne nécessite pas de dépenses onéreuses car il utilise les données des dossiers existants des services de

consultations et des pharmacies pour évaluer les facteurs associés à l'émergence des résistances (observance mesurée par le retrait des ARV dans les délais, rétention dans les soins à 12 mois, absence de rupture de stocks à la pharmacie, pratiques de prescription, et suppression virale à 12 mois quand le test de CV est disponible) (Fokam et al., 2015; Jonas et al., 2014; Sigaloff et al., 2012; WHO 2016b).

- (2) Surveillance de la résistance transmise (TDR, transmitted drug resistance en anglais) dans les populations récemment infectées, qui classe la prévalence des TDR dans la catégorie faible (< 5%), modérée (5-15%) ou élevée (> 15%).
- (3) Surveillance de la résistance acquise (ADR, acquired drug resistance en anglais) dans les populations sous TAR depuis 12 mois ( $\pm$  3 mois) et  $\geq$  48 mois (OMS, 2014a).
- (4) Surveillance de la résistance pré-thérapeutique (PDR, pre-treatment drug resistance en anglais) chez les patients initiant un TAR et qui peuvent avoir des résistances soit transmises ou soit acquises lors d'exposition préalables aux ARV (PTME, prophylaxie post-exposition, PrEP ou traitement antérieur) (OMS, 2014b).
- (5) Surveillance de la résistance initiale chez les populations pédiatriques < 18 mois.



**Figure 13: Stratégie pour le suivi et la surveillance de la résistance du VIH aux antirétroviraux (OMS, 2014a).**

## 5. Analyse et interprétation de la résistance:

### 5.1. 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). Ils sont 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.

De plus, en cas de prescription de Maraviroc (antagoniste CCR5), un test de tropisme est réalisé afin de vérifier la présence d'un virus majoritaire utilisant le co-récepteur CCR5. Généralement, on fait un test génotypique qui analyse la séquence de la boucle V3 de la gp120 (gène env).

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 chaîne (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 ».

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 Sequencing,

en anglais) est une technique de séquençage à haut débit qui permet de détecter tous les variants minoritaires présents dans un prélèvement.

## 5.2. 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 mutagenèse 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.

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-sensibilisation ») 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: Travaux de mémoire**

## **1. Matériel et méthodes:**

### **1.1. Cadre, type d'étude et critères de sélection des patients :**

#### **1.1.1. Cadre de l'étude :**

Les échantillons ont été collectés dans les centres de conseil et de dépistage volontaires de Bamako (Mali). La numération des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> a été effectuée au niveau de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance du VIH aux ARV (SEREFO) -Bamako.

L'unité de **Biologie moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU Aristide Le Dantec** a servi de cadre pour la réalisation des tests génotypiques de résistance.

#### **1.1.2. Type d'étude et critères de sélection des patients:**

Il s'agissait d'une étude transversale de surveillance de la résistance transmise.

#### **Population d'étude:**

-Elle a été sélectionnée dans des zones géographiques où les ARV sont déjà utilisés et où l'accès aux trithérapies est relativement uniforme.

-Délai  $\leq$  6 mois

#### **Critères d'inclusion:**

- Patient (homme ou femme) VIH-1 ou VIH-1/VIH-2 positif,
- Naïf de traitement antirétroviral
- De moins de 25 ans et/ou récemment infectée et/ou immunocompétent (taux de CD4  $\geq$  500 cellules/mm<sup>3</sup>)
- Ayant donné son consentement.

#### **Critères d'exclusion :**

- Absence d'information sur une exposition antérieure aux ARVs
- Absence d'information sur le stade clinique.

### **1.2. Prélèvement et conservation des échantillons :**

Après consentement éclairé du patient, dans deux tubes EDTA de 5 ml étiquetés, du sang veineux a été prélevé au niveau du pli du coude à l'aide d'un système de prélèvement sous vide en respectant les précautions universelles d'hygiène et de sécurité. Les prélèvements ont été transférés (dans les 3h suivant le prélèvement) au laboratoire (SEREFO).

Sur le 1<sup>er</sup> tube, ont été réalisés les tests sérologiques du VIH selon l'algorithme en vigueur dans le pays et la numération des lymphocytes TCD4.

Sur le 2<sup>ème</sup> tube, une séparation lymphocytaire a été réalisée par centrifugation en vue de récupérer le plasma qui a ensuite servi à la réalisation des tests génotypiques de résistance.

**Matériel de prélèvement :**

- ✓ Un tube EDTA de 5ml (2)
- ✓ Une aiguille vacutainer
- ✓ Un tampon imbibé d'alcool
- ✓ Un garrot
- ✓ Une paire de gant
- ✓ Une poubelle
- ✓ Un pansement

**Matériels de préparation des échantillons :**

- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Pipettes pasteur
- ✓ Cryotubes

**Identification et anonymisation des prélèvements :**

Un numéro d'anonymat a été attribué à chaque prélèvement de façon à ne pas reconnaître l'identité du patient (principe de l'enquête anonyme non corrélée – aucune liste de correspondant numéro d'anonymat/identité du patient ne sera constituée). Ce même numéro a été reporté sur la fiche de renseignement clinique accompagnant chaque prélèvement qui a comporté les items suivants : voir annexe 3.

Les tests à effectuer pour la résistance primaire ont été la mesure du taux de LT CD4<sup>+</sup> et le génotypage de résistance.

**1.3. La taille des échantillons :**

Echantillonnage fait selon le protocole générique proposé par l'OMS (Protocol for evaluation of transmitted HIV drug resistance using specimens from HIV sentinel serosurveys in resource-limited settings- draft version Jan 19, 2005) : Basé sur une méthode d'échantillonnage séquentiel binomial, évalue qu'un minimum de 47 échantillons éligibles collectés consécutivement est nécessaire pour l'estimation de la prévalence des résistances sur un site déterminé.

**1.4. Analyses au laboratoire :**

**Constitution de la plasmathèque**

Au laboratoire, l'heure de réception des prélèvements a été notée de même que l'heure de conservation des aliquotes. A partir du 2<sup>ème</sup> tube de prélèvement, nous avons réalisé dans un délai de 3-4 heures au maximum une séparation du plasma des globules rouges par centrifugation à 2500 tours/mn pendant 10-15 minutes. Le plasma a ensuite été distribué en aliquotes de 1 ml dans 3-4 cryotubes à l'aide d'une pipette à usage unique stérile. Les

cryotubes ont ensuite été conservés rapidement à -20°C jusqu'à leur transfert au LBV/UCAD à Dakar. Ce transfert a été effectué dans les conditions de maintien de la congélation dans de la carboglace.

### **Tests sérologiques et numération des LT CD4<sup>+</sup>**

Un test sérologique de confirmation sur site a été effectué sur tous les prélèvements selon les procédures en vigueur.

La numération des lymphocytes TCD4 a été effectuée sur site si la dernière mesure n'a pas été faite dans les 3 derniers mois précédant l'inclusion.

### **Tests génotypiques de résistance**

Un test de génotypage a été réalisé sur tous les échantillons de résistance transmise selon les critères prédéfinis au niveau du LBV/HALD qui est le laboratoire National accrédité par l'OMS pour la réalisation des tests génotypiques de résistance aux ARV.

Le génotypage de résistance a été effectuée en utilisant le protocole de l'ANRS AC11 (<http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>). Il s'agit d'une technique « maison » consistant à réaliser 2 amplifications séparées des gènes de la *protéase* et des 240 premiers acides aminés de la TI du VIH-1. Ces amplifications se font à partir de l'ARN extrait du plasma par RT-PCR en une seule étape, suivie d'une 2<sup>ème</sup> PCR de façon à générer 2 fragments de 507pb couvrant la totalité de la protéase et les 798 premières bases de la TI. Les produits de PCR purifiés font par la suite l'objet d'un séquençage direct utilisant les amorces de 2<sup>ème</sup> round de la PCR. Pour chaque échantillon, les séquences des 2 gènes sont assemblées puis éditées à l'aide du logiciel Seqman de la suite DNASTar afin de générer une séquence consensus constitué d'un fragment unique PR-TI.

### **Analyse des données de séquençage**

Les informations sur les échantillons qui n'ont pas pu être séquencé ont été reportées pour répertorier les raisons de l'échec : extraction, amplification, séquençage, et les facteurs associés, le volume insuffisant, l'échantillon contaminé ou hémolysé. Les chromatogrammes et l'analyse de mutations ont été sauvegardés pour chaque échantillon.

Toutes les séquences générées ont été éditées à l'aide du logiciel Seqman de la suite DNASTar. 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). La phylogénie a été réalisée en utilisant la méthode des distances, option Phy ML (GTR). L'analyse de recombinaison a été réalisée à l'aide des outils REGA HIV-1 subtyping tool v3.0 et HIV BLAST et du logiciel Simplot v3.5.1 (Lole et al. 1999). Les séquences ont été soumises à l'outil CPR de la base de données de Standford HIVdb version 8.7 pour l'analyse de la qualité des séquences et des mutations.

### **Analyses statistiques des données**

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Excel et R v.3.3.1.

## **1.5. Aspects éthiques et règlementaires :**

### **Information et consentement**

Une lettre d'information expliquant l'objectif et les résultats attendus de ce travail a été remis aux patients afin d'obtenir leur consentement. Seuls les patients ayant donné un consentement libre et éclairé ont été inclus dans cette étude.

### **Informatisation et confidentialité des données**

Les données cliniques et virologiques enregistrées lors de cette étude, ont fait l'objet d'un traitement informatisé. Les données des patients restent strictement confidentielles et anonymes. Seuls les médecins, biologistes et représentants du promoteur impliqués dans le déroulement de l'étude pourront avoir accès aux données.

### **Bénéfices pour le patient**

Les résultats de génotypage ont été transmis au centre de prise en charge du patient lorsqu'une résistance à une ou à des molécules antirétrovirales ARV est détectée. Les résultats de génotypage ont permis une meilleure connaissance de la résistance aux ARVs dans un contexte de santé publique chez des populations infectées par des variants différents, dans différentes zones géographiques.

### **Avis du comité d'éthique**

Le protocole, la notice d'information et le formulaire de consentement ont été soumis au comité d'éthique préalablement au démarrage. Leur avis a été complété par l'obtention de l'autorisation administrative par les autorités de santé.

## 2. Résultats et Discussion:

### 2.1. Résultats :

#### 2.1.1. Description de la population d'étude :

Du 22 juin 2015 au 02 septembre 2016, 49 patients naïfs de traitement ARV ont été recrutés dans les centres de conseil et de dépistage volontaires de Bamako la capitale du Mali. L'âge median des patients était de 23 ans [IQR : 20 et 25 ans]. Tous les patients étaient compris dans la tranche d'âge de 18 à 25 ans. Le sexe féminin était prédominant avec 87,76% et un sex-ratio de 0.14. Le tableau VII présente la description générale de la population d'étude.

**Tableau VII: Description générale de la population d'étude.**

Caractéristiques	Effectifs	Pourcentages
Sexe		
<b>Féminin</b>	<b>43</b>	<b>87,76</b>
Masculin	6	12,24
Age (année)		
[18-25]	49	100,00

#### 2.1.2. Caractéristiques immunologiques

Le taux de LT CD4<sup>+</sup> à été réalisé pour 45 patients sur les 49, avec comme taux de LT CD4<sup>+</sup> médian 139 cellules/mm<sup>3</sup> [IQR : 58 et 324]. Le tableau VIII présente la répartition des patients selon le taux de LT CD4<sup>+</sup>.

**Tableau VIII: Répartition des patients en fonction du taux de LT CD4<sup>+</sup>**

LT CD4 <sup>+</sup>	Effectifs	Pourcentages (%)
<b>&lt;200</b>	<b>28</b>	<b>57,14</b>
200-499	11	22,45
≥500	06	12,25
CD4 Non réalisé	04	08,16
Total	49	100

### 2.1.3. Géotypage de résistance

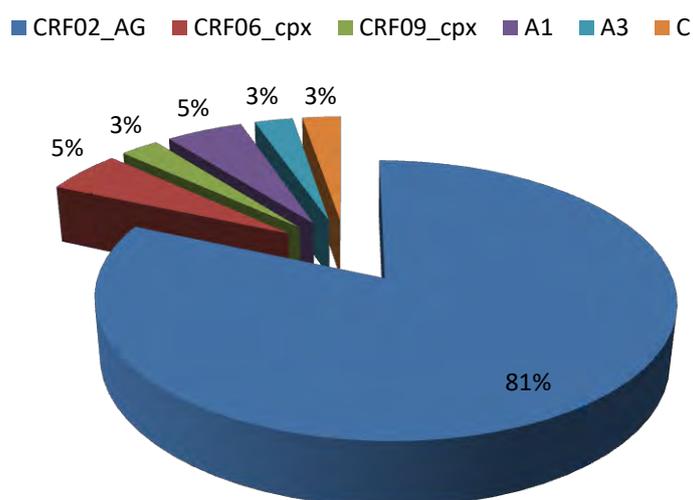
#### - Taux d'amplification réussi

Sur les 49 échantillons, un total de 38 échantillons ont pu être amplifiés et séquencés au niveau de la région Pol codant pour la reverse transcriptase (240 premiers acides aminés) soit un taux d'amplification réussi de **77,55%**.

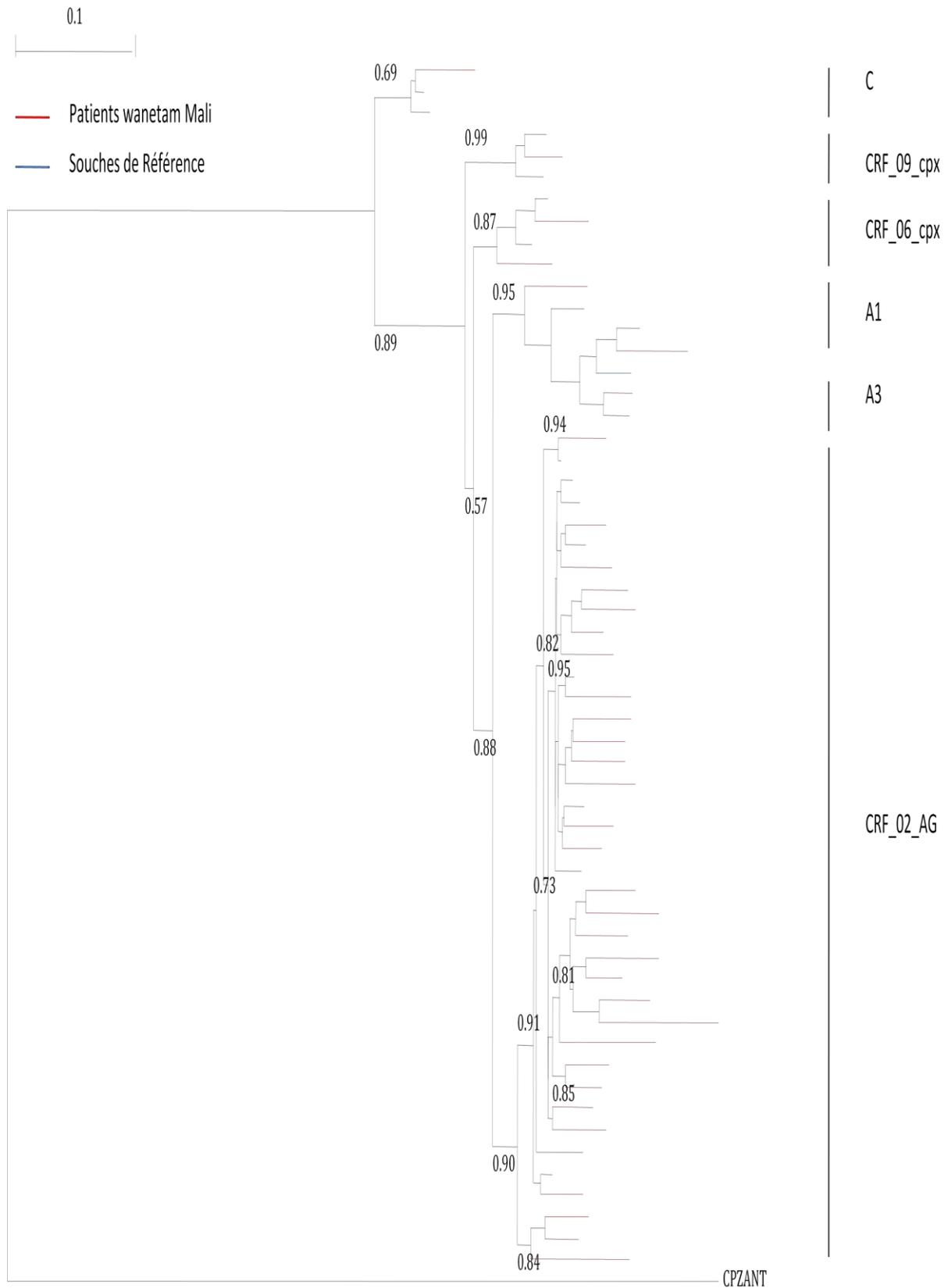
#### - Caractérisation moléculaire des souches rencontrées

L'amplification a été suivie de l'analyse phylogénétique avec le logiciel Seaview, et le logiciel Simplot 2.6 a été utilisé pour la recherche des recombinaisons.

Au terme de l'analyse phylogénétique, le **CRF02\_AG** était le sous-type prévalent, soit **81,58%** (31/38), une analyse approfondie des autres souches a permis de confirmer le CRF09\_cpx (01), le CRF06 (02), le A1 (02), le A3 (01) et le C (01).



**Figure 14: Répartition des souches en fonction des sous-types.**



**Figure 15 : Arbre phylogénétique des souches (RT, 773 pb).**

- **Les mutations de résistance rencontrées**

Sur les 38 échantillons qui ont pu être amplifiés et séquencés au niveau du gène Pol pour la RT, quatre (04) des souches avaient présentés au moins une mutation de résistance. Ceci correspond à un taux de prévalence globale de la résistance transmise de **10,53%** (04/38).

- **Mutations portant sur les INTIs**

Les mutations M184V et K65R ont été retrouvées chez un même patient. Soit un taux de résistance aux INTIs de **2,63%**.

- **Mutations de résistance portant sur INNTIs**

La mutation K103N était la plus représentée (n=03), les mutations L100I (01), Y188L (01), et Y181C (01) ont également été retrouvées. Soit un taux de résistance aux INNTIs de **10,53%**.

**Tableau IX: Mutations de résistance portant sur les INTIs et les INNTIs.**

Sequence ID	SDMR des INTIs	SDMR des INNTIs
565WML	<b>K65R, M184V</b>	<b>L100I, Y188L</b>
624WML	-	<b>K103N</b>
652WML	-	<b>K103N</b>
839WML	-	<b>K103N, Y181C</b>

**2.2. Discussion:**

Du 22 juin 2015 au 02 septembre 2016, nous avons réalisé une étude transversale portant sur l'évaluation de la résistance primaire pour laquelle nous avons enrôlé 49 patients naïfs de TARV selon les recommandations de l'OMS relatives à la surveillance de la résistance du VIH-1 aux ARV. Les limites et difficultés liées à la réalisation de cette étude ont été entre autre le délai de recrutement des patients relativement long et la méconnaissance de la date de séroconversion pour certains patients. Toutefois les résultats obtenus à l'issue des travaux nous ont permis d'évaluer la résistance primaire du VIH-1 aux ARV chez les patients.

**2.2.1. Population d'étude :**

Les patients étudiés ont été recrutés entre juin 2015 et septembre 2016, incluant tous les patients âgés de moins de 25 ans et/ou récemment infectée et/ou immunocompétente, VIH-1 ou VIH-1/VIH-2 positif dans les centres de conseil et de dépistage volontaires de la capitale

du Mali (Bamako). Nous avons ainsi recruté 49 patients. L'âge médian des patients était de 23 ans (IQR 20-25). Le sex-ratio était de 0,14 en faveur des femmes. Ces caractéristiques sont similaires à celles retrouvés par Maïga et al., 2013, l'âge médian de leurs patients était de 24 ans [IQR 22-27].

### 2.2.2. Caractéristiques immunologiques

Le taux de CD4 a été déterminé chez 45 patients sur les 49, vingt-huit (**57,14%**) patients avaient un taux de **CD4 < 200 cellules/mm<sup>3</sup>**. Le nombre de CD4 médian était de 139 cellules/mm<sup>3</sup> [IQR : 58-324]. Ce nombre est très inférieur à celui obtenu par Maïga et al., 2013 qui était de 380 cellules/mm<sup>3</sup> [IQR 340-456] cellules/mm<sup>3</sup>.

### 2.2.3. Génotypage de résistance

Nous avons utilisé la technique de l'ANRS AC11 pour le génotypage de résistance des 49 échantillons. Trente-huit (38) échantillons ont pu être amplifiés et séquencés au niveau de la région Pol (RT, 773 pb) soit un taux d'amplification réussi de **77,55%**. Ce taux reste inférieur à ceux présentés par d'autres auteurs. Bangoura et al., 2015, ont trouvé un taux de 84,4%, idem en Tanzanie (94%), et au Sénégal (81,88%)(Johannessen et al. 2010; Diouara et al. 2014). Onze échantillons n'ont pu être amplifiés en dépit de plusieurs tentatives.

Ceci pourrait s'expliquer par la dégradation des acides nucléiques au cours du transport, de la conservation ou du stockage des plasmas avant leur acheminement au laboratoire LVB-A Le Dantec (Dakar). Mais aussi par les cycles de congélation/décongélation au niveau des deux sites, SEREFO (Bamako) et LVB Le Dantec (Dakar). Ou encore par les charges virales faibles de ces échantillons. D'ailleurs plusieurs études ont rapporté un faible taux d'amplification réussi pour des échantillons à CV < 5000 copies/ml (3,69log<sup>10</sup>) contrairement à ceux ayant des CV élevées (> 10000 copies/ml [4log<sup>10</sup>]) (Masciotra et al. 2007; Youngpairaj et al. 2008; Monleau et al. 2010; Rottinghaus et al. 2012).

Sur les 38 échantillons qui ont pu être amplifiés et séquencés, quatre (04) souches avaient présenté au moins une mutation de résistance. Notre étude a montrée une prévalence globale de **10,53%** de mutations de résistance primaire chez les patients naïfs de TARV à Bamako, au Mali. Deux études de résistance primaire ont été réalisées sur deux années consécutives, en 2005 et 2006 dans ce pays, avec des taux plus faibles de 1,5 et 2,5%, respectivement (Derache et al. 2008). Deux autres études réalisées en 2009 et en 2013 ont montré des taux plus élevés avec respectivement 9% (Haïdara et al. 2010) et 7,9% de résistance primaire (Maïga et al. 2013).

Cette augmentation s'explique par la couverture croissante des ARV dans le pays. En effet, un faible nombre de personnes était sous ARV en 2005 (environ 5000), alors qu'en 2010, près de 21000 personnes étaient initiées aux traitements au Mali (EDSM-IV 2006; EDSM-V 2013). Ces données sont similaires à celles observées dans d'autres pays d'Afrique de l'ouest. Dans la plupart des pays africains, au début de l'accès aux ARV, la transmission des virus résistants était limitée: par exemple pour la Tanzanie, le Malawi, l'Ethiopie et l'Afrique du Sud, la prévalence de la résistance primaire était < 5% (Abegaz et al. 2008; Kamoto and

Aberle-Grasse 2008; Pillay et al. 2008; Somi et al. 2008). Une autre étude à Yaoundé (Aghokeng et al. 2011), au Cameroun, a montré une prévalence croissante de mutations de résistance chez les patients naïfs au fil du temps : 0,0% en 1996-1999 ; 1,9% en 2001 ; 4,1% en 2002 et 12,3% en 2007. Des études récentes confirment ces résultats avec des niveaux modérés 5-15% à Ouagadougou, Burkina Faso (Somda et al. 2012), au Kwa-Zulu-Natal, Afrique du Sud (Hunt et al. 2012), à Kampala en Ouganda (Ndembi et al. 2011) en Europe et en Amérique du nord (Guichet et al. 2016). Toutefois, il ressort dans de nombreuses enquêtes effectuées par l'OMS que la prévalence de la résistance primaire a globalement augmentée entre 2004 et 2010, principalement la résistance aux INNTIs chez les populations récemment infectées dans les pays africains (OMS, 2012). Cette augmentation n'est pas surprenante, compte tenu du large accès aux ARV ces dernières années et surtout de l'utilisation préférentielle des INNTIs dans les combinaisons thérapeutiques de première ligne dans les pays du Sud. Cependant, malgré cette augmentation, les traitements de première ligne actuellement recommandés par l'OMS restent efficaces. Mais il sera peut être nécessaire à l'avenir d'adapter les recommandations en fonction du niveau de résistance primaire (nécessité d'un test de résistance pré-thérapeutique ou d'un IP en première ligne en l'absence de test génotypique de résistance). Par ailleurs, l'initiation de plus en plus précoce des traitements, comme cela est recommandé par les experts est un facteur d'augmentation de la résistance primaire, il est donc absolument indispensable de poursuivre cette surveillance. Les mutations observées dans notre évaluation sont : la mutation **M184V** associée à la résistance au 3TC/FTC; la mutation **K65R** associée à la résistance au TDF, ABC, d4T, ddI et 3TC/FTC ; ainsi que les mutations **K103N**, **Y181CIV**, **L100I**, **Y188L** associée à la résistance aux INNTIs de première génération (la NVP et l'EFV). Toutes ces mutations mises en évidence sont en accord avec celles retrouvées dans les précédentes études réalisées en 2010. Les mutations identifiées dans notre étude sont tout à fait en accord avec l'utilisation des molécules antirétrovirales disponibles dans le pays. Il est envisageable de penser que certains patients de notre étude aient pu être surinfectés récemment par une souche portant d'autres mutations mais que notre technique standard de génotypage n'ait pas pu les détecter. En effet, le génotypage classique selon la méthode de Sanger utilisé dans ce travail n'a certainement pas pu identifier les variants minoritaires. De principe, ce type de technique ne détecte une mutation que lorsqu'elle représente au moins 15-20% de la population virale. Par ailleurs, des études ont montré que certains variants résistants minoritaires ont des implications cliniques; en particulier, les variants résistants aux INNTIs peuvent avoir un impact sur la réponse virologique à un traitement à base d'INNTI. Actuellement, des nouvelles générations de séquençage ou NGS (Next Generation Sequencing) permettent de détecter ces variants minoritaires (1-15%), et il serait donc intéressant de réaliser des études de surveillance avec ces nouvelles technologies.

Les analyses phylogénétiques montrent que le recombinant **CRF02\_AG** est toujours le sous-type prédominant au Mali avec une prévalence de **81,58%** (31/38), suivie par le CRF06\_cpx (5%). D'autres sous-types ont également été retrouvés : CRF09\_cpx, A1, A3 et C. Cette prédominance du CRF02\_AG avait été rapportée dans des études précédentes réalisées au Mali : soit 58,7 (Diawara, 2013) et 66.7%. (Maïga et al., 2013).

## **Conclusion et perspectives:**

Les résultats de cette étude sur la résistance transmise ont permis de disposer de données récentes sur la circulation de souches résistantes au Mali. La prévalence de la résistance transmise reste modérée au Mali (**10,53% [5-15]**). Le CRF02\_AG reste la forme recombinante prédominante.

Cette étude montre une augmentation de la prévalence par rapport aux années précédentes, signe que la transmission de souches résistantes prend de l'ampleur au Mali. Des données récentes confirment que cette augmentation est générale en Afrique. Il est donc important de surveiller annuellement la prévalence de la transmission de souches résistantes.

De plus, l'accessibilité aux outils virologiques (charge virale et tests de résistance) doit être une priorité. Ceci est essentiel pour le maintien du bénéfice des traitements, ainsi que pour la prévention de la résistance primaire et acquise. Aussi, ces résultats impliquent de poursuivre la surveillance épidémiologique de la résistance primaire et acquise. Enfin, les pays devraient élaborer des plans d'investissement nationaux et prendre des mesures pour améliorer la durabilité, l'efficacité et l'efficience des services liés à l'organisation des systèmes de santé et la prise en charge des personnes infectées par le VIH en particulier. De plus, cela permettra d'améliorer l'observance ainsi que le maintien des patients dans les services de soin à travers des stratégies d'éducation thérapeutique afin de limiter l'émergence rapide de la résistance. Toutes ces mesures sont capitales, car les objectifs 90-90-90 de l'ONUSIDA en dépendent fortement.

Au décours de ce travail nous envisageons de :

- Evaluer la résistance à l'initiation du traitement (recommandations OMS)
- Evaluer la résistance à M12 et à M48 (recommandations OMS)

## **Recommandations:**

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

- Au Haut Conseil National de Lutte Contre le Sida (HCNLCS):
  - o De tenir compte de ces nouvelles données pour l'élaboration des documents normatifs de prise en charge des PVVIH.
  - o De mettre à disposition, des plateformes de charge virale et de génotypage (GNS) pour le suivi optimal des patients.
  - o De mettre en place des programmes de surveillance de résistance conformément aux recommandations de l'OMS.

## Bibliographies

- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., and Parniak, M.A.** (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 15908–15917.
- Abegaz, W. E., et al.** (2008). "Threshold survey evaluating transmitted HIV drug resistance among public antenatal clinic clients in Addis Ababa, Ethiopia." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 89-94.
- Adamson, C.S., and Freed, E.O.** (2010). Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res.* 85, 119–141.
- Aghokeng, A.F., Mpoudi-Ngole, E., Chia, J.E., Edoul, E.M., 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, 1635–1641.
- Ayouba, A., Akoua-Koffi, C., Calvignac-Spencer, S., Esteban, A., Locatelli, S., Li, H., Li, Y., Hahn, B.H., Delaporte, E., Leendertz, F.H., et al.** (2013). Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS Lond. Engl.* 27, 2488–2491.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M., and Varmus, H.E.** (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev.* 3, 469–478.
- Brenner, B.G., Oliveira, M., Doualla-Bell, F., Moisi, D.D., Ntemgwa, M., Frankel, F., Essex, M., and Wainberg, M.A.** (2006). HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS Lond. Engl.* 20, F9-13.
- Brenner, S.** (2014). Frederick Sanger (1918–2013). *Science* 343, 262–262.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrin, J., and Ho, D.D.** (1995). Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 201–208.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J.** (2007). Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science* 316, 1908–1912.
- Briggs, J.A.G., and Kräusslich, H.-G.** (2011). The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 410, 491–500.
- Centers for Disease Control (CDC)** (1981a). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 250–252.
- Chaix M-L, Descamps D, Wirden M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, et al.** (2009). Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *AIDS Lond Engl.* 23(6): 1 -24.
- 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, 1346–1347.
- Coffin, J., and Swanstrom, R.** (2013). HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., and Vogt, P.** (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.

**Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E.** (1997). *Taxonomy and Sequence Relatedness of Retroviruses* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

**Coutsinos, D., Invernizzi, C.F., Xu, H., Moisi, D., Oliveira, M., Brenner, B.G., and Wainberg, M.A.** (2009). Template usage is responsible for the preferential acquisition of the K65R reverse transcriptase mutation in subtype C variants of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 83, 2029–2033.

**Craigie, R.** (2012). The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol.* 7, 679–686.

**D'arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., et al.** (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1343-1352.

**Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A.** (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767.

**Damond, F., Worobey, M., Campa, P., Farfara, I., Colin, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., Robertson, D.L., and Simon, F.** (2004). Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 666–672.

**Danel C, Gabillard D, Inwoley A, Chaix ML, Toni TD, Moh R, et al.** Medium-term probability of success of antiretroviral treatment after early warning signs of treatment failure in West African adults. *AIDS Res Hum Retroviruses.* août 2009;25(8): 83-93.

**De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., and Willems, B.** (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* 64, 1207–1216.

**Derache, A., et al.** (2008). "Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006." *J Antimicrob Chemother*62(3): 456-463.

**Descamps D, Chaix M-L, Montes B, Pakianather S, Charpentier C, Storto A, et al.** (2010). Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naïve chronically HIV infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother.* 65(12):2620- .

**Diawara, M.** (2013). «Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois». Bamako. 76-82.

**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.

**EDSM-IV** (2006). "Enquête Démographique et de Santé du MALI, Complement." Cellule de Planification et de Statistiques (CPS), Institut National de la Statistique (INSTAT), Ministère de la Santé du Mali.

**EDSM-V** (2013). "Enquête Démographique et de Santé du MALI." Cellule de Planification et de Statistiques (CPS), Institut National de la Statistique (INSTAT), Ministère de la Santé du Mali.

**Eholié SP, Tanon KA, Folquet-Amorissani M, Ouattara I, Aba YT, Traoré-Ettiégne V, et al.** (2009). [Impact of access to antiretroviral therapy in Côte d'Ivoire]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon.* 69(5):520-4.

**Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pèpin, J., et al.** (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56–61.

**Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A.** (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.

**Fokam, J., Elat, J.-B.N., Billong, S.C., Kembou, E., Nkwescheu, A.S., Obam, N.M., Essiane, A., Torimiro, J.N., Ekanmian, G.K., Ndjolo, A., et al.** (2015). Monitoring HIV Drug Resistance Early Warning Indicators in Cameroon: A Study Following the Revised World Health Organization Recommendations. *PloS One* 10, e0129210.

- Freed, E.O.** (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496.
- Frost, S.D., Nijhuis, M., Schuurman, R., Boucher, C.A., and Brown, A.J.** (2000). Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J. Virol.* 74, 6262–6268.
- Gallant, J.E.** (2006). The M184V mutation: what it does, how to prevent it, and what to do with it when it's there. *AIDS Read.* 16, 556–559.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C.** (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci CABIOS.* 12(6):543-8.
- Garforth, S.J., Lwataula, C., and Prasad, V.R.** (2014). The lysine 65 residue in HIV-1 reverse transcriptase function and in nucleoside analog drug resistance. *Viruses* 6, 4080–4094.
- Geretti, A.M.** (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr.Opin. Infect. Dis.* 19, 1–7.
- Goodsell, D.S.** (2012). Illustrating the machinery of life: viruses. *Biochem. Mol. Biol. Educ. Bimon. Publ. Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 40, 291–296.
- Goodsell, D.S., Dutta, S., Zardecki, C., Voigt, M., Berman, H.M., and Burley, S.K.** (2015). The RCSB PDB “Molecule of the Month”: Inspiring a Molecular View of Biology. *PLoS Biol.* 13, e1002140.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O.** (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol.* 27(2):221-4.
- Guichet, E., Aghokeng, A.F., Serrano, L., Bado, G., Toure-Kane, C., Eymard-Duvernay, S., Villabona-Arenas, C.-J., Delaporte, E., Ciaffi, L., and Peeters, M.** (2016). High viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives in sub-Saharan Africa. *AIDS Res. Hum.Retroviruses.*
- Haidara, A., et al.** (2010). "High level of primary drug resistance in Mali." *HIV Med*11(6): 404-411.
- Harris, C., Small, C.B., Klein, R.S., Friedland, G.H., Moll, B., Emeson, E.E., Spigland, I., and Steigbigel, N.H.** (1983). Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 308, 1181–1184.
- Hemelaar, J.** (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* 18, 182–192.
- Hertogs, K., de Béthune, M.P., 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, 269–276.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R.** (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M.** (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123–126.
- Hunt, G. M., et al.** (2012). "Surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance in Gauteng and KwaZulu-Natal Provinces, South Africa, 2005-2009." *Clin Infect Dis*54 Suppl 4: S334-338.
- Johannessen A, Holberg-Petersen M, Lövgården G, Naman E, Ormaasen V, Matee MI, et al.** (2010). HIV type-1 drug resistance testing on dried blood spots is feasible and reliable in patients who fail antiretroviral therapy in rural Tanzania. *Antivir Ther.* 15( ):1003-9.
- Jonas, A., Sumbi, V., Mwinga, S., DeKlerk, M., Tjituka, F., Penney, S., Jordan, M.R., Desta, T., Tang, A.M., and Hong, S.Y.** (2014). HIV drug resistance early warning indicators in namibia with updated World Health Organization guidance. *PLoS One* 9, e100539.

- Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M., and Bieniasz, P.D.** (2006). Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4, e435.
- Kamoto, K. and J. Aberle-Grasse** (2008). "Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 83-87.
- Karn, J., and Graeble, M.A.** (1992). New insights into the mechanism of HIV-1 trans-activation. *Trends Genet. TIG* 8, 365–368.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., et al.** (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523–526.
- Kellam, P., and Larder, B.A.** (1994). Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 23–30.
- Krebs, C. F., Hogan, H. T, 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].
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.-F., and SEROCO-HEMOCO Study Group.** (2005). HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1053–1056.
- Laurent C, Diakhaté N, Gueye NFN, Touré MA, Sow PS, Faye MA, et al.** (2002). The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study. *AIDS Lond Engl.* 16(10):1363- 0.
- Little SJ.** (2000). Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naïve subjects. *Antivir Ther.* 5(1):33-40.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadhari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al.** (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 3(1):152-60.
- Maartens, G., Celum, C., and Lewin, S.R.** (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet Lond. Engl.* 384, 258–271.
- Maiga AI, Fofana DB, Maiga AC et al.** (2013). Transmitted antiretroviral drug resistance in newly HIV-infected and untreated patients in Ségou and Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 29(1):182-6.
- Masciotra S, Garrido C, Youngpairoj AS, McNulty A, Zahonero N, Corral A, et al.** (2007). High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *Aids.* 21(18):2503–2511.
- Menéndez-Arias, L.** (2013). Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res.* 98, 93–120.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., Mian, A.M., So, A.G., and Scott, W.A.** (1999). A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell* 4, 35–43.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., So, A.G., and Scott, W.A.** (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13471–13476.
- Monleau M, Butel C, Delaporte E, Boillot F, Peeters M.** (2010). Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *J Antimicrob Chemother.* 65(8):1562-6.

- Ndembi, N., et al.** (2011). "Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala." *AIDS*25(7): 905-910.
- OMS.** Centre des médias. VIH/Sida. Aide-mémoire. Actualisée juillet 2017.
- O.M.S. O. M. d. I. S.** (2012). "WHO HIV drug resistance report 2012." <http://www.who.int>.
- Onafuwa-Nuga, A., and Telesnitsky, A.** (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* MMBR 73, 451–480, Table of Contents.
- ONUSIDA.ONUSIDA** (2014). Programme commun des nations unies sur le VIH/sida. Accélérer la riposte : mettre fin à l'épidémie de sida d'ici à 2030.
- ONUSIDA.** Statistiques mondiales sur le VIH. Fiche d'information juillet 201 .
- Pasternak, A.O., Lukashov, V.V., and Berkhout, B.** (2013). Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 10, 41.
- Pillay, V., et al.** (2008). "Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1- infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004." *Antivir Ther*13 Suppl 2: 101-107.
- Pincock, S.** (2008). Françoise Barré-Sinoussi: shares Nobel Prize for discovery of HIV. *Lancet Lond.Engl.* 372, 1377.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F.** (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872.
- Ragni, M.V., Urbach, A.H., Kiernan, S., Stambouli, J., Cohen, B., Rabin, B.S., Winkelstein, A., Gartner, J.C., Zitelli, B.Z., and Malatack, J.J.** (1985). Acquired immunodeficiency syndrome in the child of a haemophiliac.*Lancet Lond. Engl.* 1, 133–135.
- Ren, J., Bird, L.E., Chamberlain, P.P., Stewart-Jones, G.B., Stuart, D.I., and Stammers, D.K.** (2002). Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14410–14415.
- Roberts, J.D., Bebenek, K., and Kunkel, T.A.** (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171–1173.
- Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., et al.** (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal.*Science* 288, 55–55.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H.** (1995). Recombination in HIV-1. *Nature* 374, 124–126.
- Rottinghaus EK, Ugbena R, Diallo K, Bassey O, Azeez A, DeVos J, et al.** (2012). Dried Blood Spot Specimens Are a Suitable Alternative Sample Type for HIV-1 Viral Load Measurement and Drug Resistance Genotyping in Patients Receiving First-Line Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis.* 54(8):118 -95.
- Saag M, Goodrich J, Fätkenheuer G, et al.** (2009). A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment-experienced patients infected with non-R5 HIV-1. *J Infect Dis.* 199: 1638–47.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Shet A, Berry L, Mohri H, Mehandru S, Chung C, Kim A, et al.** (2006). Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 41(4):439-46.

- Sigaloff, K.C.E., Hamers, R.L., Menke, J., Labib, M., Siwale, M., Ive, P., Botes, M.E., Kityo, C., Mandaliya, K., Wellington, M., et al.** (2012). Early warning indicators for population-based monitoring of HIV drug resistance in 6 African countries. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 54 Suppl 4, S294-299.
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F.**(1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1032–1037.
- Somda, A., et al.** (2012). "Surveillance of transmitted drug-resistant HIV among young pregnant women in Ouagadougou, Burkina Faso." *Clin Infect Dis* 54 Suppl 4: S317- 319.
- Somi, G. R., et al.**(2008). "Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania." *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 77- 82.
- Tang, M.W., and Shafer, R.W.** (2012). HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* 72, e1-25.
- Tang, M.W., Rhee, S.-Y., Bertagnolio, S., Ford, N., Holmes, S., Sigaloff, K.C., Hamers, R.L., Wit, T.F.R. de, Fleury, H.J., Kanki, P.J., et al.** (2013). Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations Associated with First-Line Stavudine-Containing Antiretroviral Therapy: Programmatic Implications for Countries Phasing Out Stavudine. *J. Infect. Dis.* 207, S70–S77.
- Tebit, D.M., Patel, H., Ratcliff, A., Alessandri, E., Liu, J., Carpenter, C., Plantier, J.-C., and Arts, E.J.** (2016). HIV-1 Group O Genotypes and Phenotypes: Relationship to Fitness and Susceptibility to Antiretroviral Drugs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*
- Telesnitsky, A., and Goff, S.P.** (1997). Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Tözsér, J.** (2010). Comparative Studies on Retroviral Proteases: Substrate Specificity. *Viruses* 2, 147–165.
- van de Vijver, D.A., Wensing, A.M.J., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.-L., Costagliola, D., De Luca, A., et al.**(2006). The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 41, 352–360.
- Villabona-Arenas, C.J., Vidal, N., Guichet, E., Serrano, L., Delaporte, E., Gascuel, O., and Peeters, M.** (2016). In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa. *AIDS Lond. Engl.*
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., and Charpentier, C.** (2016b). Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M.** (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40, 9–17.
- Weiss, R.A.** (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3, 67.
- Wensing AMJ, van de Vijver DA, Angarano G, Asjö B, Balotta C, Boeri E, et al.** (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis.* 192(6):958-66.
- Wensing, A.M., Calvez, V., Günthard, H.F., Johnson, V.A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R.W., and Richman, D.D.** (2015). 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 23, 132–141.
- WHO**, (2014a). Technical and operational consideration for implementation HIV viral load testing. Interim technical update. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/viral-load-testing-technical-update/en/> [accessed 11/01/2016].

**WHO**, 2012. World health organization global strategy for the surveillance and monitoring of HIV drug resistance.

**WHO**, 2014b. The availability and use of diagnostics for HIV: a 2012/2013 WHO survey of low- and middle-income countries. Technical report. <http://www.who.int/hiv/pub/amds/amds-diagnostics-survey-dec2014/en/> [accessed 11/01/2016].

**WHO**, 2016a. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach – Second edition 2016. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/> [accessed 22/06/2016].

**WHO**, 2016b. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance. Technical report. <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/ewi-hivdr-2016/en/> [accessed 01/08/2016].

**Wilens, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W.** (2012). HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2.

**Youngpairoj AS, Masciotra S, Garrido C, Zahonero N, Mendoza C de, García-Lerma JG.** (2008). HIV-1 drug resistance genotyping from dried blood spots stored for 1 year at 4°C. J Antimicrob Chemother. 61(6):121 -20.

**Ziegler, J.B., Cooper, D.A., Johnson, R.O., and Gold, J.** (1985). Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. Lancet Lond. Engl. 1, 896–898.



médical sera respecté par tous les scientifiques participants à ce projet et toutes les données vous concernant resteront confidentielles.

Tout ce qui est écrit ici vous sera réexpliqué par le médecin ou par l'assistant social : n'hésitez pas à poser toutes les questions que vous voudrez pour avoir plus de précisions sur les points que vous ne trouvez pas clairs. Si après ces explications vous avez envie de participer à cette étude, nous vous demanderons de bien vouloir signer le formulaire de consentement, qui indique que vous avez bien compris tout ce qui est écrit ici. Vous êtes libre également libre de refuser.



### **Annexe 3**

#### **Identification et anonymisation des prélèvements**

- ✓ Site du prélèvement
- ✓ Date du prélèvement
- ✓ Heure du prélèvement
- ✓ Numéro d'anonymisation suivi des initiales du patient
- ✓ Sexe
- ✓ Date de naissance
- ✓ Pays de naissance
- ✓ Date du 1er test de confirmation de la séropositivité VIH
- ✓ Date ou durée de mise sous ARV
- ✓ Schéma de traitement ARV en cours
- ✓ Traitements ARV antérieur s'il y'a lieu (sauf changement de ligne thérapeutique)
- ✓ Nombre de grossesse (si femme)
- ✓ Transmission probable (iatrogène, hétérosexuelle, homosexuelle)
- ✓ Notion d'exposition antérieure aux ARV
- ✓ Stade clinique OMS (SIDA)
- ✓ Taux de LT CD4<sup>+</sup> (si renseigné)
- ✓ Date de la mesure de LT CD4<sup>+</sup> (si renseigné)
- ✓ Mesure de la charge virale (si renseigné)
- ✓ Technique de mesure de la charge virale (si renseigné)

#### **Annexe 4**

Liste des amorces Transcriptase inverse

Amorces externes :

MJ3 : 5'-AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA-3'

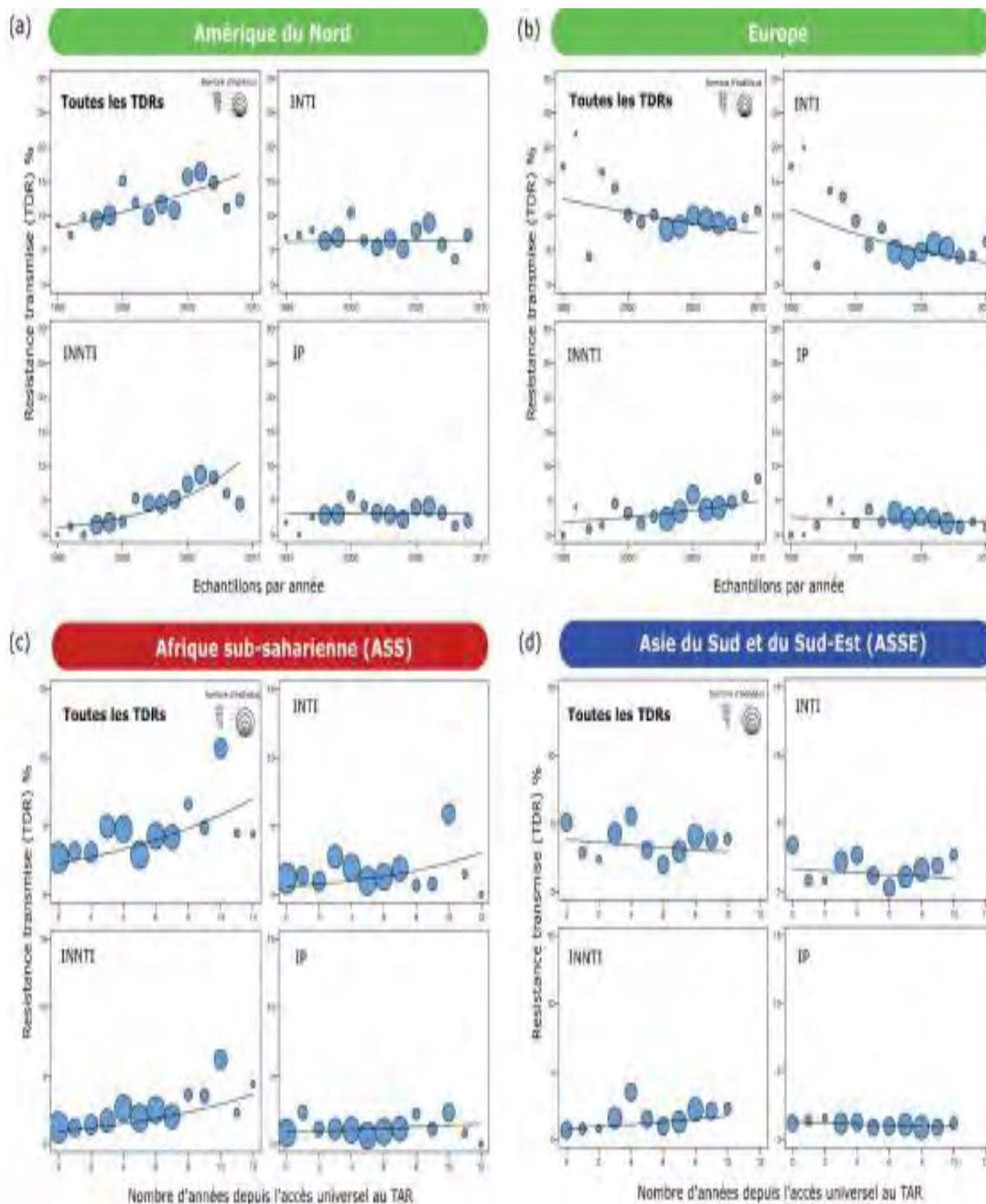
MJ4: 5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'

Amorces internes et de séquençage :

A35: 5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'

NE135: 5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'

Annexes 5



**Figure 16: Evolution de la résistance transmise dans les pays du Nord et du Sud.**

(a) Amérique du Nord, (b) Europe, (c) Afrique sub-saharienne (ASS), et (d) Asie du Sud et du Sud-Est (ASSE). Les pays du Nord sont surlignés en vert, les pays du Sud sont surlignés en bleu, et parmi-eux l’Afrique sub-saharienne où l’épidémie de VIH/SIDA est la plus importante, est surlignée en rouge (modifié d’après Rhee et al., 2015a).

