



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO

Faculté de Pharmacie

FAPH



Année
Universitaire 2017-
2018

N°/P

THESE

**Évaluation de la résistance du VIH-1 aux
antirétroviraux chez les nouveau-nés de mères
séropositives au Mali**

présentée et soutenue publiquement le 10/11/2018
devant le jury de la faculté de pharmacie
par

Mme Fatoumata Issa Diallo

pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Professeur Souleymane DIALLO
Membre : Docteur Ibréhima GUINDO
Membre : Docteur Ousmane TRAORE
Co-directrice : Docteur Djeneba Bocar FOFANA
Directeur : Professeur Flabou BOUGOUDOGO

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE -Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA -Professeur

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN Contrôleur des finances

PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boulkassoum	HAIDARA	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Organique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie

M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	TOURE	Entomologie Moléculaire-Médicale
M. Abdoulaye	DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Akory AG	IKNANE	Santé publique/Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Parasitologie-Moléculaire
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrehima	GUINDO	Bactériologie virologie
M. Kassoum	KAENTAO	Santé Publique/Bio statistiques
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/Bio statistiques
Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Bio statistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Saaou	COULIBALY	Biochimie clinique
Mme Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
Mme Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
M.Yaya	GOITA	Biochimie clinique
Mme Merepen dit Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
Mme.N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
M. Birama Apho	LY	Santé publique
M. yacouba	MAIGA	Bio statistique

M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
Mme. Dinkorma	OULOUEM	Biologie Cellulaire
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant - -

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Moussa	SANOGO	Gestion
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
M. Antoine DARA		Sciences pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sekou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	H AidARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Hama Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Ahmed	MAIGA	Législation
Mme. Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation

M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
Mme. Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER
M. Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Dominique patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

*Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.
" Et quant au bienfait de ton Seigneur proclame le ".
Saint Coran : sourate 93, verset 11*

Hommages aux membres du jury

Au **professeur Souleymane Diallo** : Pharmacien biologiste ; Colonel Major à la retraite du Service de Santé des Armées ; Professeur de Bactériologie et Virologie ; Ancien Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Mali.

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur, en acceptant de présider ce jury. Homme de rigueur, vos grandes qualités humaines et scientifiques, votre sens aigu de l'honneur, votre disponibilité, font de vous un maître très apprécié.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

Au **Docteur Ibréhima Guindo** :Pharmacien biologiste ; Chef du service de bactériologie - virologie INRSP ; Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP ; Maître-assistant de Bactériologie Virologie à la faculté Pharmacie de Bamako.

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Votre rigueur dans le travail, votre sens des responsabilités et votre disponibilité nous ont marqués dès notre première rencontre.

Veillez accepter, cher maître nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance.

Au **Docteur Ousmane Traoré** ; Pharmacien à l'unité de gestion des projets (UGP-PNUD) ; Responsable des achats pharmaceutiques au PNUD

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites, en acceptant de siéger dans ce jury. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Au **Docteur Djeneba Bocar Fofana** ; Pharmacienne Biologiste associée au laboratoire de virologie de l'hôpital Saint Antoine de Paris ; Maître-assistant de bactériologie-virologie à la FMOS ; Diplômée d'Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale.

Cher maître,

Ce fut pour nous une opportunité d'avoir appris à vos côtés.

Votre détermination, votre courage et votre rigueur font de vous un exemple dans le domaine de la recherche. Vos qualités humaines et intellectuelles, votre disponibilité, nous ont permis de mener à bien ce travail.

Trouvez ici cher maître, l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

Au **Professeur Flabou Bougoudogo** ;Maître de conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la faculté de pharmacie et de médecine ; Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la faculté de pharmacie ; Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012 ; chevalier de l'ordre du mérite de la Santé.

Ce fut un grand honneur pour nous d'avoir bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines.

Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Permettez-nous cher maître, de vous exprimer à travers ce travail tout notre respect et profonde gratitude.

Dédicaces et remerciements

Je dédie cette thèse

A mon père

Mon cher Baba, tu as toujours été un exemple pour nous. Tu nous as appris le respect, l'amour du prochain, la droiture et l'honnêteté. Nous n'avons jamais manqué de tes sages conseils. Saches que l'honneur de ce travail te revient. Il ne suffit, certes pas à apaiser tous les sacrifices consentis à nos égards, puisse-t-il cependant t'apporter réconfort et fierté ; et aussi le témoignage de notre profonde affection et de notre sincère attachement. Que Dieu nous prête longue vie pour que nous puissions te rendre ne ce reste qu'une infime partie de ce que tu as fait pour nous.

A ma mère

Ma douce Anna, tu es pour nous un modèle d'affection et d'une immense gentillesse. Mes frères et moi n'avons jamais manqué de ta tendresse. Tu nous as toujours appris la persévérance et la patience. Ce travail est le fruit de tes multiples efforts. Retrouve ici l'expression de notre profonde affection et notre sincère attachement. Que Dieu nous prête longue vie pour que tu puisses jouir des fruits de ce travail.

A mes frères et sœurs : Mariam, Alhousseini, Samba, Almoustapha, Alfadilatou

Que l'entente et l'affection soient toujours présentes dans nos relations et n'oublions jamais les efforts fournis par nos parents pour parfaire notre éducation et que l'unité familiale soit notre but. Puisse ce travail vous servir d'exemple.

A mes grands parents

Pour vos encouragements, votre perpétuel soutien et vos prières. Que Dieu vous bénisse pour la grande affection dont vous nous avez toujours fait preuve.

A mes oncles, tantes, cousins, cousines, neveux, nièces.

Pour m'avoir toujours encouragé dans le bon sens et pour m'avoir apporté votre aide, d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude. Mention spéciale à mon oncle Dr Abdourhamane Soumana pour son soutien.

Je remercie...

Toute l'équipe de Bactériologie-virologie de l'INRSP, Dr Ibréhima Guindo, Dr Mahamadou Abdou, Mr Alou Sanogo, Mr Demba Koita, Mr Mamadou Guindo, Mme Traoré Hawa Samaké, Dr Souleymane Ongoiba, Dr Yaya Cissé, Mr Marcel Koné, Dr Alhadji A Dicko,

Pour m'avoir accueilli les bras ouverts dans votre service et n'avoir ménagé aucun effort pour l'aboutissement de ce travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Tous mes camarades thésards des aînés aux cadets et tous ceux de ma promotion,

Pour votre soutien et vos encouragements incontestables dont vous avez fait preuve tout au long de ce travail.

Toute la 9^e promotion du numérus clausus.

Pour les six belles années que nous avons passées ensemble. Trouvez ici l'expression de mon sincère attachement.

Tous mes camarades du lycée Ibrahima Ly

Je remercie.....

Mes frères et sœurs de cœur : Mariam Dombia, Abba Barry, Malik Koulibaly, BGG.

Plus que des amis vous êtes pour moi une famille. Merci pour votre amour et votre soutien qui ne m'ont jamais fait défaut. Puisse Dieu bénir notre amitié.

Mon cher Bakary

Pour le soutien et les encouragements dont tu as fait preuve tout au long de ce travail. Pour avoir supporté mon angoisse, mes baisses de moral et avoir toujours su trouver les mots justes pour m'encourager. Trouve dans ces quelques lignes la preuve de tout mon amour.

Mes sœurs chéries : Aminta Oumar Diallo, Balkissa Soumaila, Aïssata Almahamoudou Dicko

Pour votre affection et pour la complicité qui nous lie. Merci pour tout...

Mes sœurs aînées : Bintou Aliou, Haoua Aliou et leurs filles Mariama, Djougal, Aminta

Pour votre soutien et vos mots d'encouragements tout au long de ce travail. Soyez en remercié.

Mon frère et encadreur Dr Mahamadou Abdou

Pour m'avoir accueilli les bras ouverts à l'INRSP, et m'avoir initié à la recherche. Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
<i>Objectifs</i>	3
Objectif général	3
Objectifs spécifiques	3
<i>1. Etude bibliographique</i>	4
1.1 Généralités sur le VIH.....	4
1.1.1 Historique.....	4
1.1.2 Origine et voies de transmission	5
1.1.2.1 Origine des VIH	5
1.1.2.2 Voies de transmissions du VIH	6
1.1.3 Classification, structure et organisation génomique.....	6
1.1.3.1 Classification	6
1.1.3.2 Structure de la particule virale	7
1.1.3.3 Organisation génomique.....	8
1.1.3.3.1 Gènes de structure.....	8
1.1.3.3.2 Les gènes accessoires.....	10
1.1.4 Cycle de réplication, tropisme et réservoirs	11
1.1.4.1 Cycle de réplication virale.....	11
1.1.4.1.1 Phase précoce.....	11
1.1.4.1.2 Phase tardive	12
1.1.4.2 Tropisme cellulaire et réservoirs viraux	14
1.2 Pathogenèse, diversité et diagnostic de l'infection au VIH.....	15
1.2.1 Pathogenèse.....	15
1.2.1.1 Evolution naturelle	15
1.2.1.2 Particularités pédiatriques de l'évolution de l'infection par le VIH	16
1.2.2 Diversité génétique.....	17
1.2.2.1 Diversité génétique et répartition géographique	17
1.2.2.2 Causes de la diversité génétique	19
1.2.2.2.1 Infidélité de la transcriptase inverse (TI)	19
1.2.2.2.2 Activité de l'apobec3C	19
1.2.2.2.3 Recombinaisons génétiques	19
1.2.2.2.4 Pression de sélection	21
1.2.2.3 Conséquences de la diversité génétique	21
1.2.3 Diagnostic biologique de l'infection à VIH	21
1.2.3.1 Diagnostic sérologique ou indirect	21
1.2.3.2 Diagnostic direct.....	22
1.3 Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux.....	23
1.3.1 Traitement antirétroviral.....	23
1.3.1.1 Objectifs du traitement	23
1.3.1.2 Principe du traitement :	24
1.3.1.3 Les classes thérapeutiques	24
1.3.1.3.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	25

1.3.1.3.1.1	Les inhibiteurs nucléotidiques /nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTIs) ..	25
1.3.1.3.1.2	Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	26
1.3.1.3.2	Les inhibiteurs de protéase.....	26
1.3.1.3.3	Les inhibiteurs d'intégrase	26
1.3.1.3.4	Les inhibiteurs de CCR5	27
1.3.1.3.5	Les inhibiteurs de fusion	27
1.3.1.3.6	Les inhibiteurs de maturation.....	27
1.3.1.4	Protocole thérapeutique (58)	27
1.3.1.4.1	Traitement de l'adulte et l'adolescent	28
1.3.1.4.1.1	Schéma de première ligne pour le VIH-1	28
1.3.1.4.1.2	Schéma de première ligne pour le vih-2 ; vih-1+vih-2 ; vih-1 groupe o.....	28
1.3.1.4.1.3	Traitement de deuxième ligne.....	29
1.3.1.4.1.4	Schéma de troisième ligne	29
1.3.1.4.2	Traitement de l'enfant	30
1.3.1.4.2.1	Schémas thérapeutiques	30
1.3.1.4.3	Traitement de la femme enceinte dans le cadre de la prévention de la transmission mère enfant PTME	30
1.3.2	Résistance aux antirétroviraux	31
1.3.2.1	Définition et classification.....	31
1.3.2.2	Mutations de résistance	32
1.3.2.3	Résistance aux différentes classes d'ARV	32
1.3.2.3.1	Résistance aux INTIs	32
1.3.2.3.2	Résistance aux INNTIs	34
1.3.2.3.3	Résistance aux IP	34
1.3.2.3.4	Résistance aux inhibiteurs d'intégrase	35
1.3.2.3.5	Résistance aux inhibiteurs de corécepteur CCR5	37
1.3.2.3.6	Résistance aux inhibiteurs de fusion (T20).....	37
1.3.2.4	Les tests de résistance.....	38
2.	Matériel et Méthodes	40
2.1.1	Méthodes	40
2.1.1.1	Cadre d'étude	40
2.1.1.1.1	Description de l'INRSP	40
2.1.1.2	Type et période de l'étude	41
2.1.1.3	Population d'étude.....	41
2.1.1.4	Taille de l'échantillon.....	41
2.1.1.5	Critères d'inclusion	41
2.1.1.6	Critères de non inclusion	42
2.1.2	Matériels.....	42
2.1.2.1	Matériels Biologiques.....	42
2.1.2.2	Matériels de laboratoire.....	42
2.1.3	Techniques utilisées	42
2.1.3.1.1	Prélèvement et stockage des échantillons	42
2.1.3.1.2	Extraction de l'ADN proviral	42
2.1.3.1.3	Réaction de PCR	42
2.1.3.1.3.1	Principe de la PCR.....	42
2.1.3.1.3.2	Technique utilisée	43
2.1.3.1.3.3	Amorces utilisées	44

2.1.3.1.3.4	Préparation du mélange réactionnel	45
2.1.3.1.3.5	Programmation du thermocycleur :	46
2.1.3.1.3.6	Electrophorèse sur gel d'agarose	47
2.1.3.1.4	Purification des produits de la PCR nichée	48
2.1.3.1.5	Séquençage	49
2.1.3.1.5.1	Principe	49
2.1.3.1.5.2	Technique utilisée	50
2.1.3.1.5.3	Amorces	50
2.1.3.1.5.4	Préparation du mélange réactionnel	50
2.1.3.1.5.5	Paramétrage du thermocycleur	50
2.1.3.1.5.6	Purification des produits de la reaction de séquence	Erreur ! Signet non défini.
2.1.3.1.5.7	Migration électrophorétique.....	52
2.1.3.1.6	Analyse des séquences (chromatogramme)	52
2.1.3.1.7	Détermination du profil de résistance	52
2.1.3.2	Collecte des données	52
2.1.3.3	Traitement et analyse des données	52
2.1.3.4	Considération éthique	53
3.	<i>Résultats</i>	54
3.1	Caractéristiques sociodémographiques des patients	54
3.2	Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des patients	56
3.3	Résultats de la PCR	57
3.4	Résultats du séquençage	58
4.	<i>Commentaires et discussion</i>	63
•	<i>Les limites de notre étude</i>	68
5.	<i>Conclusion</i>	69
6.	<i>Recommandations</i>	70
7.	<i>Références</i>	72
8.	<i>Annexes</i>	80

Liste des tableaux

Tableau I : schémas préférentiel et alternatif de première ligne pour le vih-1	28
Tableau II : schémas préférentiel et alternatif de première ligne pour le vih-2 ; vih-1+vih-2 ; vih-1 groupe O	29
Tableau III : schémas préférentiel et alternatif de deuxième ligne pour le VIH-1	29
Tableau IV : schémas préférentiel et alternatif de troisième ligne pour le VIH-1	30
Tableau V : liste des amorces externes utilisées pour amplifier les trois gènes de réplication du VIH par PCR	44
Tableau VI : liste des amorces internes utilisées pour amplifier les trois gènes de réplication du VIH par PCR	44
Tableau VII : composition du mélange réactionnel pour la PCR classique	45
Tableau VIII : composition du mélange réactionnel pour la PCR nichée.....	46
Tableau IX : programme du thermocycleur pour la PCR classique	46
Tableau X : programme du thermocycleur pour la PCR nichée.....	47
Tableau XI : composition du mix pour la réaction de séquence.....	50
Tableau XII : programme et profils de température utilisés pour la réaction de séquence.	51
Tableau XIII : composition du mélange réactionnel pour la purification des produits de réaction de séquence.....	51
Tableau XIV : répartition des patients en fonction de la provenance.....	55
Tableau XV : répartition des patients en fonction du type d'allaitement	56
Tableau XVI : répartition des patients en fonction de la prophylaxie ARV reçue à la naissance.....	57

Liste des figures

Figure 1 : phylogénie des VIH et origine simienne des VIH-1(13).....	6
Figure 2 : structure du VIH (16)	8
Figure 3 : structure génomique de l'ADN proviral du VIH -1 .(16).....	9
Figure 4 : cycle de réplication du VIH(14)	13
Figure 5 : classification en fonction du tropisme viral(23).	14
Figure 6 : histoire naturelle de l'infection à HIV non traitée.(24)	16
Figure 7 : distribution de la Charge virale chez le nourrisson infecté par le VIH sans traitement antirétroviral (29)	17
Figure 8 : exemple de virus recombinant CRF27_cpx(14).....	20
Figure 9 : mécanisme de formation d'un virus recombinant dans un contexte de coinfection (37).	20
Figure 10 : cinétique des marqueurs virologiques au cours de la primo-infection VIH en l'absence de traitement antirétroviral (14).	23
Figure 11 : cycle de multiplication du VIH et sites d'action des différentes classes des molécules antirétrovirales(24).	25
Figure 12 : mutations de résistance associées aux INTI selon <i>HIV db version 8.7</i>	34
Figure 13 :mutations de résistance aux INTI selon <i>HIV db version 8.7</i>	34
Figure 14 : mutations de résistance aux IP selon <i>HIV db version 8.7</i>	35
Figure 15 : mutations de résistance aux Inhibiteurs d'intégrase selon <i>HIV db version 8.7</i>	36
Figure 16 : mutations de résistance à l'enfuvirtide selon «international AIDS society» (IAS)2017.....	38
Figure 17 : principe du séquençage selon la méthode de Sanger(78)	50
Figure 18 : répartition des patients en fonction de la tranche d'âge.	55
Figure 19 : répartition des patients en fonction des signes cliniques	56
Figure 20 : résultats de l'amplification des gènes	57
Figure 21 : répartition des patients en fonction des sous-types du vih-1	58
Figure 22 : fréquence des mutations de résistance associées aux INTI	59
Figure 23 : fréquence des mutations de résistance associéesaux INNTI	60

Figure 24 : fréquence des mutations majeures de résistance associées aux IP	60
Figure 25: fréquence des mutations mineures de résistance associées aux IP	61
Figure 26: fréquence des mutations mineures de résistance associées aux I.INT	62

Liste des sigles et abréviations

3TC :	Lamivudine
ABC :	Abacavir
ABI:	Applied Biosystems
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AIDS:	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANRS :	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales
APOBEC3:	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing C3
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARV:	Antirétroviral
AZT:	Zidovudine
BET:	Bromure d'ethidium
CA p24:	Capside Antigen de 24 kDa
CCR5:	CC chemokine Receptor type 5
CD4:	Cluster of differentiation 4
CD8 :	Cluster of differentiation 8
CDC:	Center for Disease control and prevention
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
CPI:	Complexe de préintégration
CRFs:	Circulating Recombinant Form
CRMT:	Centre Regional de médecine Traditionnel de Bandiagara
CV:	Charge Virale
CXCR4:	CXC chemokine receptor type 4
D4T:	Stavudine
DAP:	Département administration et personnel
DBS:	Dried Blood Spots
DC-SIGN :	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3- Grabbing x
DDI:	Didanosine
ddNTP:	2', 3'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DDRb:	Département diagnostique et recherche biomédicale
DF:	Département Formation
DMT:	Département médecine traditionnelle
dNTP:	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DSC:	Département santé communautaire
EDS :	Enquêtes Démographiques et de Santé
EDSM-V:	Enquêtes Démographiques et de Santé au Mali V
EDTA :	Ethylène diamine tétraacétique
EFV :	Efavirenz
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Env:	Envelope
EPA:	Etablissement public à caractère administratif
EPST:	Etablissement public à caractère scientifique et technique
ETR:	Etravirine
FDA:	Food and Drug Administration
FIV:	Feline Immunodeficiency Virus
FTC:	Emtricitabine
Gag:	Group antigen
gp:	Glycoprotéine
Gp120SU:	Glycoprotéine de surface de 120 kDa Glycoprotéine
GP41TM:	Glycoprotéine transmembranaire 41 kDa
HAART:	Highly active antiretroviral therapy
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HIV-1:	Human Immunodeficiency Virus type 1
HIV-2:	Human Immunodeficiency Virus type 2
HSH :	Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres Hommes
HTLV-1 :	Human T-lymphotropic Virus 1 xi
IAS :	International AIDS Society
IMAARV:	Initiative malienne d'accès aux ARV
INNTI :	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INRSP :	Institut National de Recherche en Santé publique
INTI :	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP:	Inhibiteurs de Protéase
KDA:	Kilodaltones
LAV:	Lymphadenopathy Associated Virus
LPV/r:	Lopinavir boosté par ritonavir
LTR:	Long Terminal Repeat
mL:	Millilitre
MSM:	Men who have Sex with Men
NC:	Nucléocapside
Nef:	Negative expression factor
NFV :	Nelfinavir
NVP :	Nevirapine
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
ONUSIDA :	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
ORF :	Open Reading Frame
P17 MA :	Protéine de matrice de 17kDa
P24 CA :	Protéine de capsid de 24kDa
P31 :	Protéine intégrase de 31kDa
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEC :	Prise en charge
Pol :	Polymerase

PPI:	pour préparation injectable
PR :	Protéase
Pr160Gag/ Pol :	Polyprotéine Gag – Pol
Pr55Gag :	Pol Polyprotéine Gag
PTME :	Prévention de la transmission mère-enfant du VIH
PVVIH :	Personne vivant avec le VIH
rev:	regulator of expression virus
RNase H:	Ribonucléase H
RPV:	Rilpivirine
SGA:	Single Genom Amplification
SIDA :	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
SIV cpz:	Simian Immunodeficiency Virus of Chimpanzee
SIV gor:	Simian Immunodeficiency Virus of gorilla
SIV:	Simian Immunodeficiency Virus
SIV:	Simian immunodeficiency virus
SIVssm:	Simian Immunodeficiency Virus of Sooty Mangebey
SP1/SP2 :	Specificity protein 1
SU :	Sous Unité
TAM :	Thymidine Analog Mutations
TAR :	trans-activation responsive region
Tat :	trans-activator of transcription
TBE:	Tris Borate EDTA
TDF :	Ténofovir
TI :	Transcriptase Inverse
TM :	Transmembranaire
TME:	Transmission mère enfant
UNAID:	United Nations Programme on HIV/AIDS
URF :	Unique Recombinant Form
UV:	Ultraviolet
Vif :	Virion Infectivity Factor
VIH 1/2:	Virus de l'Immunodéficience Humaine type1/Type2
Vpr :	viral protein R, gène codant la protéine virale R
Vpu :	viral protein U, gène codant la protéine virale U
Vpx :	viral protein X, gène codant la protéine virale X
µL :	Microlitre

Introduction

Trois décennies après sa découverte, le VIH/SIDA reste l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde, particulièrement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire(1).

L'Organisation des Nations Unies contre le SIDA (ONUSIDA) et l'Organisation mondiale de la Santé indiquaient dans leur rapport annuel de 2017 que sur 36.9 millions de personnes vivants avec le VIH dans le monde, les enfants de moins de 15 ans représenteraient 1.8 millions avec 180000 nouvelles infections contre 270000 en 2010 soit une réduction de 35%(2).

L'Afrique subsaharienne reste la région la plus touchée avec 25.6 millions de personnes infectées. Elle concentre également près des deux-tiers des nouvelles infections dans le monde(3).

Au Mali la 5^{ème} enquête démographique (EDSM-V) réalisée en 2012 montre une baisse du taux de prévalence de 1.3% à 1.1% faisant du Mali un pays à faible taux de prévalence. En 2015 le nombre de personnes adultes âgées de 15 ans et plus vivant avec le VIH était estimé à 110 000, les enfants de 0 à 14 ans restent touchés par cette pandémie avec 12000 enfants infectés (4).

La prise en charge de cette infection repose sur des classes thérapeutiques qui agissent à différents niveaux du cycle de réplication du virus. Plus d'une vingtaine d'antirétroviraux de ces classes sont actuellement disponibles.

L'avènement de la trithérapie en 1996 a permis d'atteindre l'objectif du traitement antirétroviral qui est de réduire considérablement la mortalité et la morbidité liée au VIH/SIDA, en bloquant la réplication du virus VIH à tel point que la charge virale soit indétectable et restaurer le système immunitaire des patients(5).

La disponibilité des ARV à prix subventionné a été instituée au Mali en 2001 avec l'initiative malienne d'accès aux ARV (IMAARV)(6). A partir de cette date le traitement ARV a considérablement réduit le taux de mortalité et de morbidité, amélioré la qualité de vie et transformé la perception du VIH /SIDA qui est devenu une maladie chronique avec laquelle on peut vivre.

Cependant en absence de vaccin et de molécules permettant actuellement d'éradiquer le virus, le traitement ARV est à vie. Comme toute chimiothérapie, les patients peuvent être sujet à un échec thérapeutique. En effet, la toxicité et les effets secondaires à long terme des ARV peuvent entraîner un problème d'adhésion au traitement, qui, couplé à un manque de suivi approprié, entraînent l'émergence des résistances aux médicaments. Cette émergence de la résistance peut compromettre un traitement ARV ultérieur chez le patient. Aussi, la transmission de virus résistants aux personnes nouvellement infectées met à l'épreuve les possibilités thérapeutiques déjà restreintes dans les pays à ressources limitées.

Les enfants constituent particulièrement une population vulnérable pour l'infection à VIH. Dans les pays en développement la prise en charge thérapeutique n'est malheureusement pas accompagnée d'un suivi virologique adéquat (charge virale, tests de résistance). En effet, le suivi virologique est important et déterminant pour l'initiation du traitement, la mesure de son efficacité ainsi que le contrôle de l'émergence de virus résistant. Le manque du suivi virologique chez les nouveau-nés et enfants constitue une entrave de plus dans leur prise en charge déjà délicate.

Deux approches sont utilisées pour évaluer la résistance du VIH aux ARV : les tests phénotypiques et les tests génotypiques. Ces derniers ont l'avantage d'être rapide, facile à exécuter, reproductible et standard. Quant aux tests phénotypiques, ils présentent plusieurs limites. Ils ne permettent pas de prédire adéquatement l'issue clinique lorsqu'on est en présence d'une population virale mixte (virus sauvages et virus mutés). De plus, ils possèdent un coût trois fois plus élevé que celui d'un test génotypique. Pour ces raisons, ils ne sont pas recommandés pour les analyses de routine.

Au Mali très peu de données sont disponibles sur la résistance aux ARV en milieu pédiatrique, d'où l'intérêt de cette étude qui consiste à évaluer la prévalence de la résistance primaire du VIH-1 aux ARV chez des nouveau-nés de mères séropositives au moment du dépistage précoce.

Objectifs

Objectif général

Evaluer la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les nouveau-nés de mères séropositives au Mali.

Objectifs spécifiques

- Décrire le profil sociodémographique, clinique et thérapeutique des nouveau- nés ;
- Déterminer le taux de mutations de résistance associées aux antirétroviraux chez les nouveau-nés en précisant les différentes classes d'ARV auxquelles elles confèrent une résistance ;
- Identifier les différents sous types de VIH-1 qui circulent chez ces nouveau-nés.

1. Etude bibliographique

1.1 Généralités sur le VIH

1.1.1 Historique

Le docteur Michael Gottlieb(américain 1947) et ses collègues décrivent en 1981 trois nouveaux cas de patients au sein de la communauté homosexuelle de Los Angeles (USA) dont les signes cliniques regroupent des infections pulmonaires : pneumonies à *Pneumocystis jiroveci* (7) identifié anciennement comme *Pneumocystis carinii*, du muguet buccal et un amaigrissement sévère (8). Le« *Center for Diseases Control and Prevention* »(CDC) d'Atlanta conclut à « un dysfonctionnement de l'immunité cellulaire liée à une exposition commune ».

En Juin 1981, un patient présentant des signes similaires est détecté à l'hôpital Claude Bernard de Paris en France. D'autres patients originaires de l'actuelle République Démocratique du Congo sont identifiés en Belgique. Très vite, la notion d'épidémie est évoquée car tous les continents sont atteints.

En 1982, les chercheurs découvrent que la transmission de l'agent pathogène peut se faire également par le sang (héroïnomanes, hémophiles...). La maladie est nommée : Syndrome d'Immunodéficience Acquisée (SIDA).

En mai 1983, Luc Montagnier (Français 1932), Françoise Barré Sinoussi (Française 1947) et leur équipe sont les premiers à isoler l'agent responsable du SIDA auquel ils donnent le nom de LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) et déposent une demande de brevet pour un test du dépistage de la maladie en septembre 1983. Un an après, Robert Gallo (américain 1937) isole à son tour le virus du Sida et lui donne le nom de HTLV-3(9). En 1985, aux Etats-Unis, les premiers tests de dépistage sont mis sur le marché ainsi que les premiers essais thérapeutiques avec de l'Azidothymidine (AZT).

En 1986, un deuxième type de virus isolé d'un patient originaire d'Afrique de l'ouest est découvert par l'équipe de Virologie de l'Hôpital Claude Bernard sous la direction de Françoise BRUN-VÉZINET. Ce virus est caractérisé par François CLAVEL de l'équipe de Luc Montagnier comme un nouveau type de LAV (LAV-2)(10). En 1986, la communauté scientifique adopte le nom de HIV (Human Immunodeficiency Virus) pour la nomenclature du virus, le LAV-1 et le LAV-2 sont nommés respectivement HIV-1 et HIV-2. La plus ancienne souche caractérisée rétrospectivement par PCR sur du matériel anatomique conservé

remonte à 1959. D'après « l'horloge moléculaire », le VIH-1 serait apparu vers 1930, par passage à l'homme d'un virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé (SIVcpz).

C'est seulement en 1994 que l'identification du virus est attribuée officiellement à l'Institut Pasteur (11). Plus tard en 2008, Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi seront récompensés par le prix Nobel de Médecine. Les premiers enfants infectés par le VIH ont été repérés dans le Bronx à partir de 1984. La transmission de la mère à l'enfant a été décrite en 1984 et la transmission par le lait maternel en 1987(12).

Les premières trithérapies donnent des résultats très encourageants dès 1996 mais la plupart ne furent disponibles pour les enfants des pays industrialisés qu'à partir de 1997 et bien plus tard en 2004 pour les pays aux ressources limitées.

1.1.2 Origine et voies de transmission

1.1.2.1 Origine des VIH

De nombreuses données attestent l'origine simienne des VIH-1 et VIH-2. Actuellement, au moins 12 transmissions du singe à l'Homme ont été documentées(13), quatre à l'origine des quatre groupes du VIH-1 (groupes M, N, O et P) et huit ou neuf pour le VIH-2. Après transmission à l'Homme, le VIH-1 groupe M a commencé à se diversifier et est aujourd'hui divisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et de nombreuses formes circulantes recombinantes (CRF). La diversité du VIH ne cesse d'augmenter du fait d'évènements de coinfections ou de surinfections mais également du fait de la sélection de souches résistantes au traitement antirétroviral.

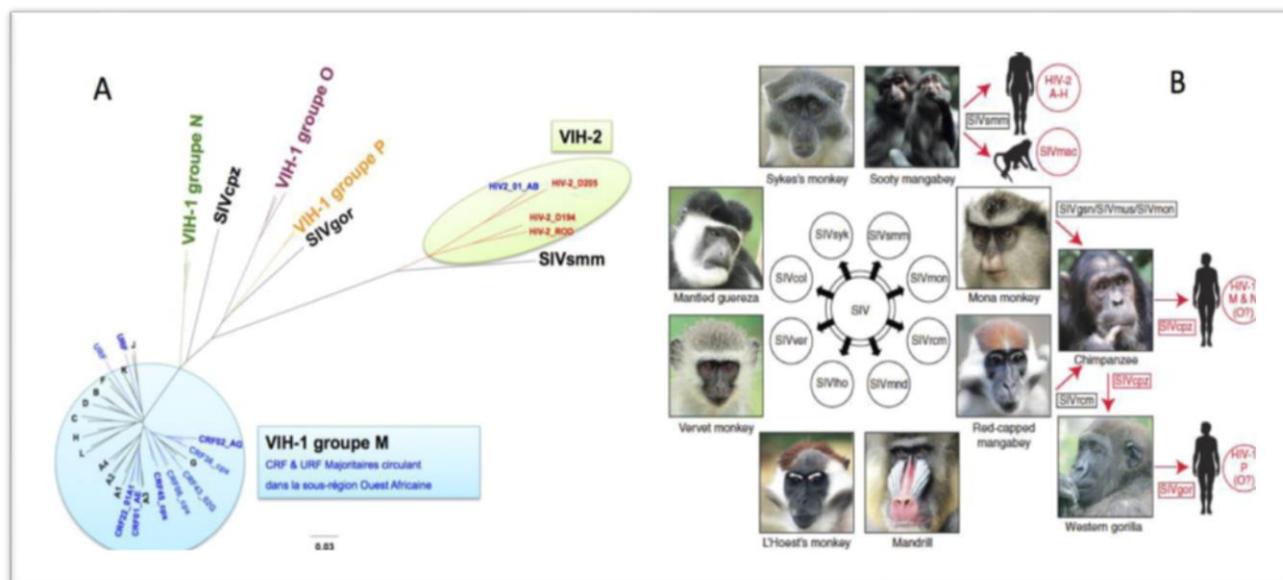


Figure 1 : phylogénie des VIH et origine simienne des VIH-1(13)

1.1.2.2 Voies de transmissions du VIH

Le VIH peut être isolé de la plupart des liquides biologiques : sang, sperme, sécrétions vaginales, lait maternel etc... Le virus peut se transmettre par voie sexuelle, par voie sanguine ou de la mère infectée à son enfant (TME). La transmission sexuelle se fait par contact entre les sécrétions sexuelles, les muqueuses génitales. Le mode de contamination par voie sanguine concerne tout particulièrement les usagers de drogues injectables, les transfusés, les professionnels de santé. La transmission mère enfant (TME) ou transmission verticale est à l'origine de la majorité des infections à VIH chez les enfants de moins de dix ans. Elle se fait soit au cours de la grossesse (fin de grossesse le plus souvent), soit au moment de l'accouchement, soit durant l'allaitement, souvent prolongé et mixte. L'infection chez l'enfant peut aussi résulter de sévices sexuels.

1.1.3 Classification, structure et organisation génomique

1.1.3.1 Classification

Les Virus de l'Immunodéficience Humaine appartiennent à la famille des *Retroviridae* dont les virus se distinguent par la présence d'une enzyme virale caractéristique : la transcriptase inverse (TI) ou Reverse Transcriptase (RT). Les virus de cette famille sont classés en trois sous-familles et sept genres selon des critères de pathogénicité et de morphologie. On

distingue les sous familles : *Oncovirinae*, *Lentivirinae* et *Spumavirinae* ; et les genres : *Spumavirus*, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*(14).

Les Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH font partie de la sous-famille des *Lentivirinae* et ils appartiennent au genre *Lentivirus*. Le VIH-1 est responsable d'une pandémie mondiale alors que le VIH-2, avec lequel il partage 50% d'homologie de séquence, est principalement retrouvé en Afrique de l'Ouest.

Sur la base d'analyses phylogénétiques de souches virales isolées de patients vivant dans des régions géographiques différentes, les VIH sont subdivisés en types, groupes, sous- types, sous sous-types, formes recombinantes circulantes (CRFs) et en formes recombinantes uniques (URFs)(15).

1.1.3.2 Structure de la particule virale

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 90 à 120 nanomètres de diamètre, produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées. Le génome du VIH-1 de polarité positive a une longueur d'environ 9200 nucléotides. L'enveloppe virale est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales : la glycoprotéine transmembranaire (gp41) et la glycoprotéine d'enveloppe externe (gp120). L'enveloppe protège la capsid interne ou « core » du virus qui renferme une matrice (MA) composée de protéines p17 puis une capsid (CA) composée de protéines p24. Le génome du VIH-1, contenu dans la capsid et associé à la nucléocapsid (NCp7), est constitué de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive, liées de façon non covalente en 5'. Les trois enzymes virales indispensables à la réplication : la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (INT) et la protéase (PR) sont contenues dans le core viral. Des protéines accessoires du VIH tels que les protéines **Vif** et **Vpr** sont contenues dans les particules virales et jouent un rôle fondamental dans l'infectivité virale.

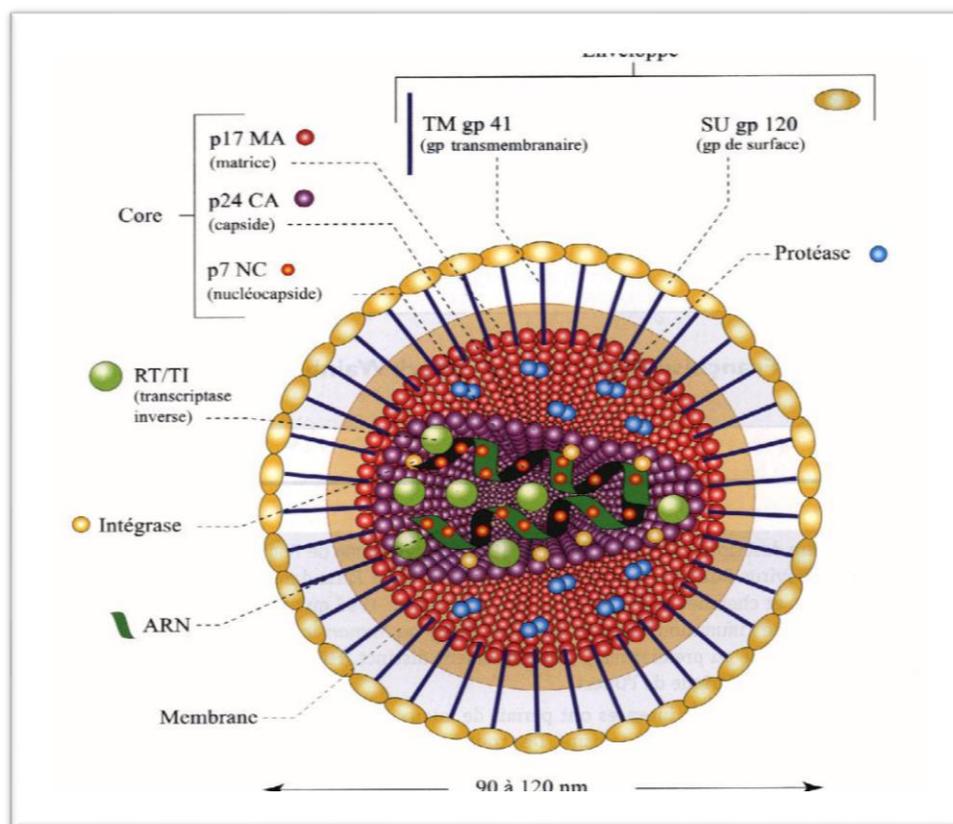


Figure 2 : structure du VIH (16)

1.1.3.3 Organisation génomique

1.1.3.3.1 Gènes de structure

Le génome du VIH-1 est constitué de trois principaux gènes appelés **gag** ('group antigen specific'), **pol** ('polymerase gene') et **env** ('enveloppe gene') qui codent respectivement pour les antigènes de la nucléocapside, les enzymes nécessaires à la réplication virale et pour les protéines de surface du virion. Ils définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus.

L'ARN viral coiffé en 5' et polyadénylé en 3' est encadré par deux courtes séquences répétées adjacentes aux séquences uniques U5 et U3 présentes respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARN. Dans la cellule hôte, la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin est complexe et génère une duplication des séquences U5 et U3 conduisant à la formation de séquences répétées directes aux deux extrémités du génome : les LTR (« Long Terminal Repeat »), constitués des régions U3, R et U5 (Figure 3)

L'ADN proviral est encadré par les deux LTR. En plus des trois gènes de structure *gag*, *pol* et *env*, codant respectivement les protéines structurales internes, les trois enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe, le VIH-1 a six gènes supplémentaires, régulateurs de la réplication virale.

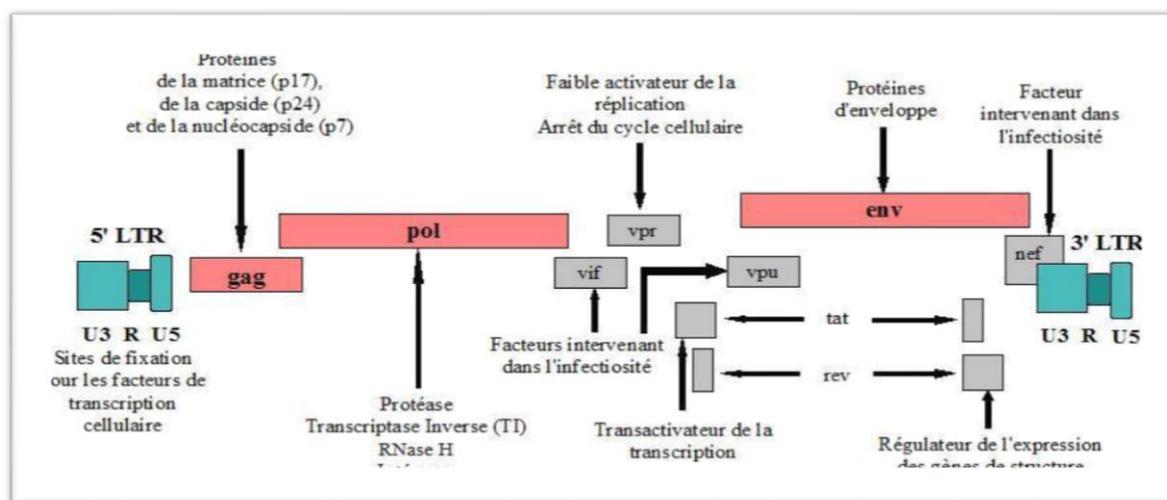


Figure 3 : structure génomique de l'ADN proviral du VIH -1.(16)

Le gène *gag* a une longueur d'environ de 1500pb et correspond au premier cadre de lecture ouvert sur le génome viral. Il code pour des protéines de la structure interne du virus, p17 MA (matrice), p24 CA (capside), p7 NC (nucléocapside) et la protéine p6 résultant du clivage du précurseur p55_{gag} par la protéase au cours de la maturation. Ce gène joue un rôle dans l'assemblage protéique et le bourgeonnement des particules virales(17).

Le gène *pol* (*polymerase*) composé de 3000 nucléotides, code pour les enzymes virales. Il comporte de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', les régions qui codent respectivement la protéase (p11 PR), la transcriptase inverse (p51/66 RT), et l'intégrase (p32 IN).

La *protéase* (PR) est un homodimère composé de sous-unités de 99 acides aminés. Elle clive « gag » en des protéines de structures.Elle est essentielle à la maturation de la particule virale.

La *transcriptase inverse* (TI) est un hétérodimère comprenant deux sous-unités p66 et p51 qui comprennent respectivement 560 et 440 acides aminées. Ces deux sous-unités proviennent

du même ARN messager avec cependant des similarités structurales limitées. La TI est une ADN polymérase ADN/ARN dépendante permettant la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN. L'activité polymérase est portée par la sous-unité p66. La TI est caractérisée par une faible fidélité due à l'absence d'activité exonucléasique 3'-5' la rendant ainsi responsable en partie de la grande variabilité génétique observée chez les rétrovirus.

L'intégrase (INT) catalyse l'intégration de l'ADN viral généré durant le processus de rétrotranscription dans le génome de la cellule hôte. L'intégrase du VIH-1 est une protéine de 32kDA (288 acides aminés) qui contient 3 domaines (le noyau catalytique, le domaine C et N-Terminal). Ces 3 domaines sont essentiels au processus d'intégration. Elle clive les extrémités de l'ADN proviral, puis l'ADN cellulaire, où s'intégrera l'ADN viral. Ensuite, l'intégrase rapproche l'extrémité 3' de l'ADN proviral du site d'insertion dans l'ADN cellulaire (18).

Le gène *env* (enveloppe), d'une longueur d'environ 2500 nucléotides, est la partie du génome viral la plus variable. Il est caractérisé par un polymorphisme important qui permet l'échappement du virus au système immunitaire. Le gène *env* code pour les glycoprotéines de surface (gp120) et transmembranaires (gp41), qui sont impliquées dans l'entrée du virus, la fusion des cellules et la cytolyse. Ces protéines sont issues du clivage d'un précurseur, la gp160. La gp120 contient le site de liaison des récepteurs CD4 et les sept domaines transmembranaires de récepteurs de chimiokines qui servent de corécepteurs pour le VIH-1.

1.1.3.3.2 Les gènes accessoires

Ils sont situés entre *Pol* et *env* (Figure 3). Il s'agit d'une part des gènes *tat* et *rev* dits de régulation et d'autre part des gènes dits auxiliaires (*vif*, *vpr*, *nef*, *vpu* pour le VIH-1 et *vpx* pour le VIH-2). Les gènes *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef* sont présents aussi bien chez le VIH-1 que le VIH-2 ; par contre, le gène *vpu* est présent seulement chez le VIH-1, les SIVcpz, SIVgor, ainsi que le SIV infectant certains petits singes d'Afrique. Le gène *vpu* est l'homologue du gène *vpx* chez le VIH-2, le SIVsmm et certains SIV de petits singes d'Afrique.

Les gènes accessoires codent pour des protéines régulatrices ou accessoires, dénommés **Tat**, **Rev**, **Vif**, **Vpr**, **Vpu** et **Nef**.

Le gène *vif* code pour la protéine Vif (facteur d'infectivité virale) qui permet une meilleure maturation des virions et un nombre réduit de particules virales défectueuses.

Le gène *vpr* code la protéine Vpr (protéine virale r) qui facilite le transfert du complexe de préintégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule hôte.

Le gène *rev* code la protéine Rev (régulation de l'expression des protéines virales) qui inhibe l'épissage des ARNm viraux et permet leur transport vers le cytoplasme pour la traduction.

Le gène *tat* code la protéine Tat (transactivateur de la transcription) qui active la transcription virale en augmentant l'efficacité de l'initiation de la transcription à partir du promoteur LTR.

Le gène *vpu* exprime la protéine Vpu (protéine virale u) présente seulement chez le VIH-1, et facilite la libération des particules virales lors du bourgeonnement et permet aussi la dégradation du LTCD4+ et le transfert de gp160 vers la membrane.

Le gène *nef* code la protéine Nef (facteur de régulation négatif) qui joue un rôle fondamental dans la propagation du virus et l'évolution de l'infection vers le SIDA. Au niveau des cellules infectées, elle diminue l'expression du récepteur CD4 (19) et des molécules du CMH de classe I (20).

L'organisation génomique du VIH-1 est similaire à celle du VIH-2 (50% d'homologie) mais avec une différence au niveau du gène *vpu* pour le VIH-1 et *vpx* pour le VIH-2.

1.1.4 Cycle de réplication, tropisme et réservoirs

1.1.4.1 Cycle de réplication virale

La réplication du VIH se fait en plusieurs étapes successives depuis l'entrée du virus dans la cellule hôte, jusqu'à la libération de nouvelles particules virales à l'extérieur de la cellule.

Cependant, elle se résume en deux phases, l'une dite précoce et l'autre tardive.

1.1.4.1.1 Phase précoce

L'entrée du virus dans la cellule est la conséquence d'une reconnaissance entre la glycoprotéine gp120 virale et son récepteur spécifique présent à la surface de la cellule cible, la molécule CD4. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel de la gp120 qui permet à une région spécifique, la boucle V3 d'interagir avec des corécepteurs (CCR5 et CXCR4) également présents à la surface de la membrane cellulaire. Cette interaction met en contact la glycoprotéine virale transmembranaire gp41, avec la membrane cellulaire et il en résulte la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte. La capsid du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule et la

rétrotranscription du génome viral débute. Les complexes VIH-1 intra-cytoplasmiques, depuis leur entrée dans la cellule jusqu'à l'achèvement de la rétrotranscription sont appelés « complexe de rétrotranscription ». Au sein des « complexes de rétrotranscription », l'ARN viral est rétrotranscrit dans le cytoplasme par la TI en ADN complémentaire (ADNc) ou ADN (-) alors que l'ARN viral est dégradé par une activité ribonucléase H de la TI. C'est lors de cette synthèse d'ADNc que la TI, polymérase peu fidèle (car dépourvue d'une activité exonucléase 3' vers 5') introduit des erreurs qui seront à l'origine d'une grande part de la variabilité génétique du VIH. La TI permet ensuite la synthèse du second brin d'ADN ou brin (+), utilisant le brin (-) comme matrice. C'est également à ce niveau qu'interviennent certaines protéines accessoires du VIH-1 (**Vif** et **Vpr**) dans le maintien de l'intégrité du génome viral et/ou la modulation du taux de mutation virale via des interactions avec des partenaires cellulaires.

Pendant l'étape de la rétrotranscription, les complexes, sont transportés activement vers le noyau. L'achèvement de la rétrotranscription est concomitant à la décapsidation et la formation des complexes de pré-intégration nucléoprotéique appelés CPI contenant, outre l'ADN double brin, des protéines virales : l'intégrase, la matrice, la TI et la protéine **Vpr** ainsi que des protéines de l'hôte liant l'ADN. Au sein de ce complexe, l'intégrase assure sa première fonction à chacune des deux extrémités de l'ADN viral (maturation). Le CPI traverse ensuite la membrane nucléaire et l'ADN viral s'intègre au sein de l'ADN cellulaire grâce à la deuxième fonction de l'intégrase appelé transfert de brin. Cette étape d'intégration dans le génome de la cellule hôte est très complexe et, dans un certain nombre de cas, l'ADN proviral reste sous forme linéaire et est dégradé ou se circularise en formant des formes à 1 ou 2 LTR(21).

1.1.4.1.2 Phase tardive

Elle succède à la phase précoce et conduit à la libération de nouveaux virus par la cellule, dépendant du type et de l'état d'activation de la cellule infectée. Le virus utilise alors la machinerie cellulaire pour se répliquer : la transcription de l'ADN proviral en ARN génomique est assurée en effet par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Deux protéines virales interviennent alors : **Tat** qui régule l'élongation de la transcription et **Rev** qui joue un rôle dans le transport de l'ARN génomique complet ou épissé vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les ARN messagers viraux de différentes tailles codent pour les polyprotéines env ou gag/Pol et pour les protéines accessoires. Après l'assemblage de ces polyprotéines virales et l'encapsulation de l'ARN viral, les nouvelles particules formées bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire. La maturation des protéines virales est assurée par la protéase virale.

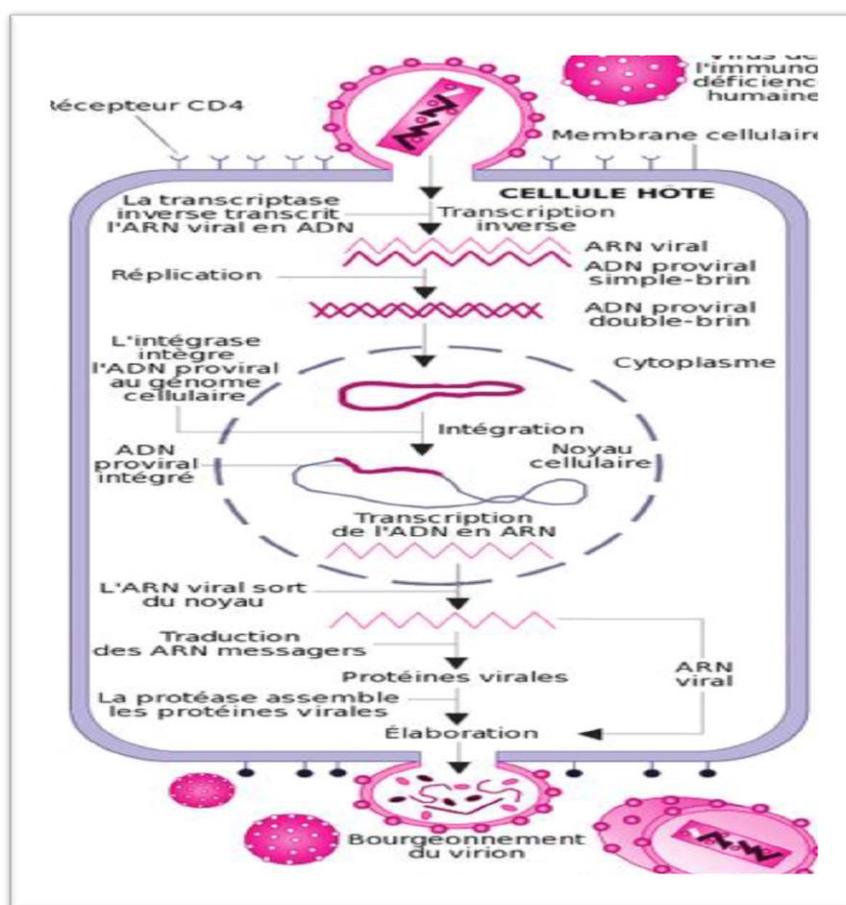


Figure 4 : cycle de réplication du VIH(14)

1.1.4.2 Tropisme cellulaire et réservoirs viraux

Le VIH infecte les cellules qui expriment le récepteur CD4 c'est-à-dire les lymphocytes T CD4+, les cellules de la lignée monocyte/macrophage et les cellules microgliales du cerveau, mais l'expression seule de CD4 ne suffit pas, un second récepteur ou corécepteur est nécessaire. Il s'agit préférentiellement de CCR5, ou de CXCR4, récepteurs aux chimiokines. L'emploi préférentiel de l'un ou l'autre corécepteur détermine le tropisme des souches virales. Celles-ci peuvent être lymphotropiques pour le CXCR4 (tropisme T) ou macrophagiques pour le CCR5 (tropisme M) (Figure 5). Les souches R5 infectent uniquement des cellules exprimant le CCR5 à leur surface (macrophages, cellules dendritiques, cellules TCD4+ activées) alors que les souches X4 ciblent et infectent exclusivement celles exprimant le CXCR4 (cellules TCD4+ naïves).(22)Cependant,les souches X4/R5 n'ont aucune préférence et infectent les cellules exprimant l'un ou l'autre des corécepteurs.

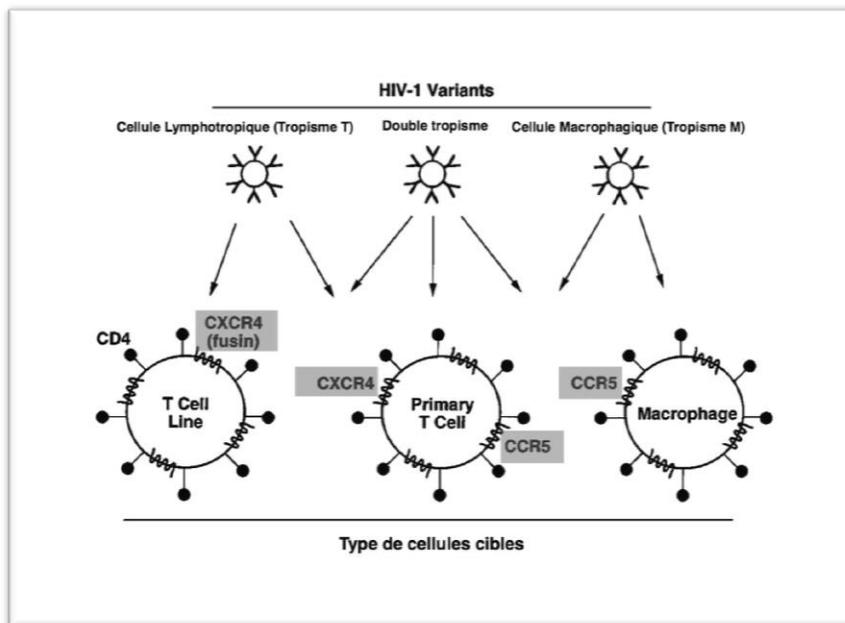


Figure 5: classification en fonction du tropisme viral(23).

Dans d'autres cellules non activées (au repos), les virus sont simplement quiescents, donc en latence, leurs ADN sont intégrés à ceux des cellules hôtes (provirus). En plus de ces provirus, les éléments constitutifs des réservoirs viraux sont : les ADN viraux non intégrés et les particules virales situées dans des compartiments à l'abri du système immunitaire et des

molécules antirétrovirales. Les cellules dans lesquelles les virus peuvent être en latence sont les lymphocytes TCD4+ (cellule mémoire du système immunitaire), les macrophages et les cellules folliculaires dendritiques présentes dans les centres germinatifs des ganglions (16).

1.2 Pathogenèse, diversité et diagnostic de l'infection au VIH

1.2.1 Pathogenèse

L'infection par le VIH aboutit à la destruction progressive des lymphocytes T CD4+ via différents mécanismes dont l'effet cytopathogène du virus et la réponse immune cytotoxique de l'hôte.

1.2.1.1 Evolution naturelle

Elle se déroule en plusieurs phases :

La phase de primo-infection, très souvent asymptomatique peut montrer des symptômes discrets et souvent confondus à un syndrome grippal. Ces symptômes sont caractérisés par la présence de fièvre, de maux de tête, de maux de gorge, de douleurs musculaires, d'adénopathies et parfois d'une atteinte neurologique. Cette phase se caractérise par une forte réplication virale (production de 10¹⁰ particules virales par jour) ayant pour conséquence une destruction massive des lymphocytes T CD4+ (Figure 6). Cette destruction peut être due soit à l'effet cytopathogène du virus, soit à la lyse induite par les lymphocytes T CD8+cytotoxiques.

La primo-infection est ensuite suivie par la mise en place de la réponse immunitaire spécifique, induisant ainsi une diminution de la charge virale. Pendant cette phase asymptomatique, dont la durée peut varier entre 8 et 12 ans, ont lieu simultanément la réplication virale et la destruction progressive du système immunitaire. Pendant plusieurs années, les lymphocytes TCD4+ sont rapidement renouvelés jusqu'à ce que l'altération des organes lymphoïdes centraux ne permette plus leur régénération. Il s'ensuit une phase pré-SIDA où le système immunitaire affaibli ne peut plus combattre les infections opportunistes qui émergent, avant d'aboutir à la phase SIDA. La charge virale (quantification de l'ARN VIH plasmatique) et le taux de LTCD4+ sont fortement corrélés à l'évolution de la maladie. Ces deux paramètres font partie des éléments du suivi biologique des PVVIH. Quant aux anticorps anti-VIH, dont la détection est utilisée pour le diagnostic sérologique d'une infection à VIH, ils ne sont détectables qu'à partir du 21ème jour après l'infection, et l'Ag p24 dès le 14ème jour (Figure7)

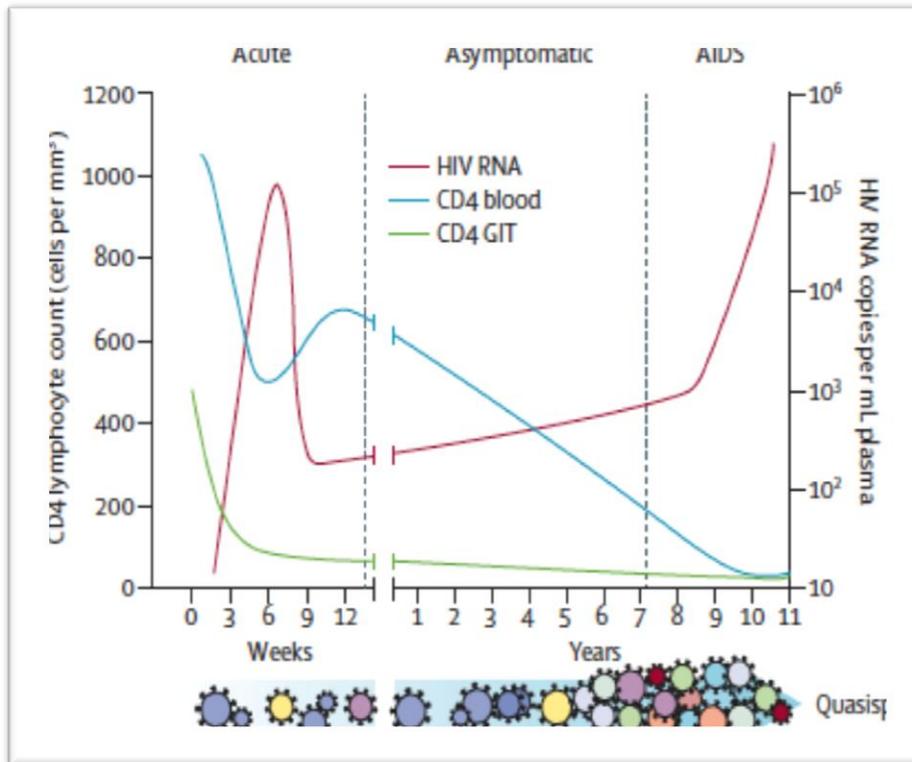


Figure 6 : histoire naturelle de l'infection à HIV non traitée.(24)

1.2.1.2 Particularités pédiatriques de l'évolution de l'infection par le VIH

Dans les pays à ressources limitées, l'évolution de l'histoire naturelle de la maladie permet de distinguer 3 groupes : (25)

- Les progressseurs rapides qui représentent environ 25 % à 30 % et sont le plus souvent contaminés in utero ou au cours de la période périnatale précoce. Ils présentent rapidement des manifestations sévères de la maladie, le risque de décès avant l'âge d'un an est élevé (>50%).
- Les enfants qui développent précocement des symptômes avec une dégradation rapide de l'état clinique pour lesquels le risque de décès se situe entre 3 et 5 ans (environ 50 % à 60 % des enfants contaminés).
- Les survivants à long terme (5 % à 25 %) qui vivent au-delà de l'âge de 8 ans. (26, 27) Les nourrissons infectés sont particulièrement difficiles à prendre en charge dans un contexte de ressources limitées, avec des problèmes d'accessibilité aux soins, mais aussi des réticences des parents ou des tuteurs à participer aux activités de soins de

l'infection VIH, en raison de nombreuses conséquences discriminatoires et stigmatisantes qui peuvent découler de la divulgation de leurs statuts. (28)

En termes de charge virale, le modèle d'évolution du titre d'ARN du VIH circulant chez les nourrissons infectés en période périnatale diffère de celui de l'adulte. Les taux d'ARN du VIH atteignent des valeurs élevées ($> 100\ 000$ copies/ml) à l'âge de 2 mois et restent élevés pendant les douze premiers mois pour ensuite diminuer progressivement les années suivantes (Figure 7). Ce modèle reflète l'incapacité du système immunitaire immature du nourrisson à limiter la réplication virale et le plus grand nombre de cellules sensibles au virus. Le risque de décès est proportionnel à la CV et à l'âge de l'enfant.

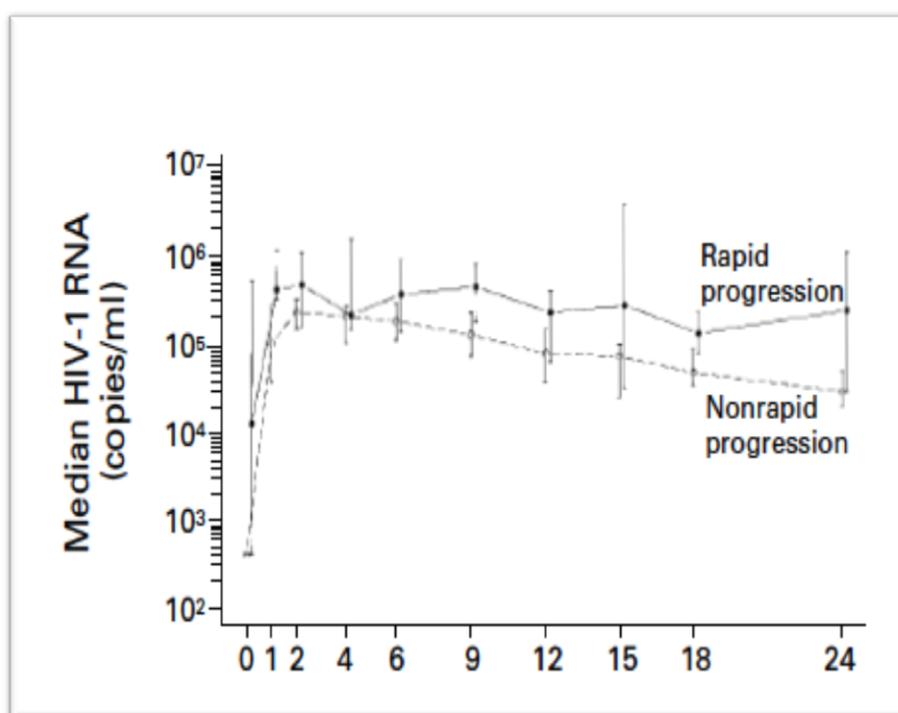


Figure 7 : distribution de la Charge virale chez le nourrisson infecté par le VIH sans traitement antirétroviral(29)

1.2.2 Diversité génétique

1.2.2.1 Diversité génétique et répartition géographique

A l'heure actuelle, deux types de VIH ont été décrits : le VIH type 1 (VIH-1) et le VIH type 2 (VIH-2).

Le VIH-1 est subdivisé en quatre groupes (M, N, O et P). Le VIH-1 groupe M (Majeur ou Major) décrit en 1983, responsable de l'actuelle pandémie est divisé en 9 **sous-types**

identifiés par des lettres de l'alphabet de A-D, F-H, J et K dont le sous-type C, majoritaire, est responsable de la moitié des infections dans le monde (30-32). Du fait de la variabilité génétique entre certains groupes de séquences, certaines souches virales appartenant à un même sous-type sont subdivisées en **sous sous-types** à l'instar de A1, A2, A3, A4, et A5 pour le sous type A, F1 et F2 pour le sous type F (31). Les VIH-1 du groupe O (Outlier ou divergent), découvert en 1990(33) semblent être endémiques dans la partie Ouest de l'Afrique centrale en particulier au Cameroun, où la fréquence de l'infection est estimée entre 2 à 5% du total des personnes infectées par le VIH-1 (34). Les VIH-1 du groupe N (non-M non-O), décrits en 1998 sont des formes virales assez particulières et ont été observés seulement chez quelques individus (<20) camerounais (35). Le VIH-1 groupe P, a été identifié seulement chez deux patients camerounais en 2009 (36).

Dans les cas de coinfections ou de super-infections chez un même individu par des sous-types différents de VIH-1, des phénomènes de recombinaison entre les virus distincts permettent l'émergence de virus recombinants ou « Circulating Recombinant Form » (CRF)(37). Un virus est classé CRF s'il a été identifié chez au moins trois individus sans aucun lien épidémiologique ; autrement il est décrit comme un URF(38).

Le VIH-2 est subdivisé en neuf groupes allant d'A à I.

La répartition géographique de ces différents sous-types est variable (<http://www.hiv.lanl.gov>). Le sous type B est largement prédominant en Europe, en Amérique du Sud et du Nord, tandis qu'en Inde, en Afrique du Sud et de l'Est, il s'agit du sous type C(39). En Amérique Latine, les CRFs et URFs sont dérivées des sous-types B et F ou B et C. En Asie du Sud et Sud-Est, les CRFs et URFs sont dérivés du CRF01_AE et du sous-type B. En Asie de l'Est, les CRFs sont dérivés des sous- types B et C. En Afrique, les CRFs et URFs sont très complexes et impliquent de nombreux sous-types et/ou CRFs qui co-circulent localement. (40)

En Afrique de l'ouest, l'épidémie du VIH-1 est dominée par le recombinant CRF02_AG avec des proportions variables selon les pays, Côte d'Ivoire (88%)(41), Mali (72%)(42), Ghana (66%)(43), et Togo (51,2%)(44).

Le VIH-2 a une diffusion beaucoup plus limitée, et est essentiellement présent en Afrique de l'Ouest, en particulier en Guinée-Bissau, Gambie, Sénégal, Côte d'ivoire, Burkina Faso. Le virus a atteint le Mozambique et l'Angola, ex-colonies portugaises, à partir de la Guinée-Bissau et hors d'Afrique, l'Inde et le Brésil ont été touchées.

1.2.2.2 Causes de la diversité génétique

La variabilité génétique du VIH est le résultat d'un taux élevé de réplication virale associé à une faible fidélité de la transcriptase inverse favorisant un taux de mutation et de recombinaison élevé.

1.2.2.2.1 Infidélité de la transcriptase inverse (TI)

Le taux de mutations aléatoires est au moins 1000 fois plus important au niveau du génome du VIH qu'au niveau du génome humain. En effet, la TI qui permet au VIH de se répliquer, est une enzyme qui ne possède pas d'activité exonucléase 3' vers 5'. De plus, l'ARN polymérase II cellulaire contribue à l'apparition de mutations aléatoires au moment de la transcription du génome viral (45). Les erreurs introduites au cours de la rétrotranscription sont donc fréquentes et sont estimées à une erreur tous les 10000 nucléotides copiés. Le génome étant composé d'environ 10000 nucléotides, il sera introduit environ une mutation à chaque cycle de réplication. (46) Au sein de l'organisme d'une personne infectée et non traitée, on estime que 10 milliard de virions sont renouvelés chaque jour.

1.2.2.2.2 Activité de l'apobec3C

L'APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing Complex 3) est un facteur cellulaire de restriction qui appartient à la famille des cytidinedésaminase(47). Ce sont des enzymes qui introduisent des mutations au niveau de l'ARN avec le changement des cytosines (C) en uracile (U) lors de la rétrotranscription des rétrovirus, dont le VIH. Le résultat de ce changement est une mutation des nucléotides G en A sur l'ADN viral. Ce processus se passe de façon aléatoire sur l'ensemble du génome viral et entraîne à la fin l'apparition de variantes virales avec plusieurs points de mutations(48).

1.2.2.2.3 Recombinaisons génétiques

Le phénomène de recombinaison, mis en évidence en 1989 (49) est possible grâce à la capacité de la TI de « sauter » d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la rétrotranscription, créant ainsi un ADN recombinant.(50)Ainsi, lorsqu'une seule cellule est infectée par deux virions génétiquement différents, les séquences peuvent donner naissance à des formes recombinantes. L'émergence des CRF et des URF résulte de la recombinaison entre les différents sous-types au cours de la multiplication du virus.

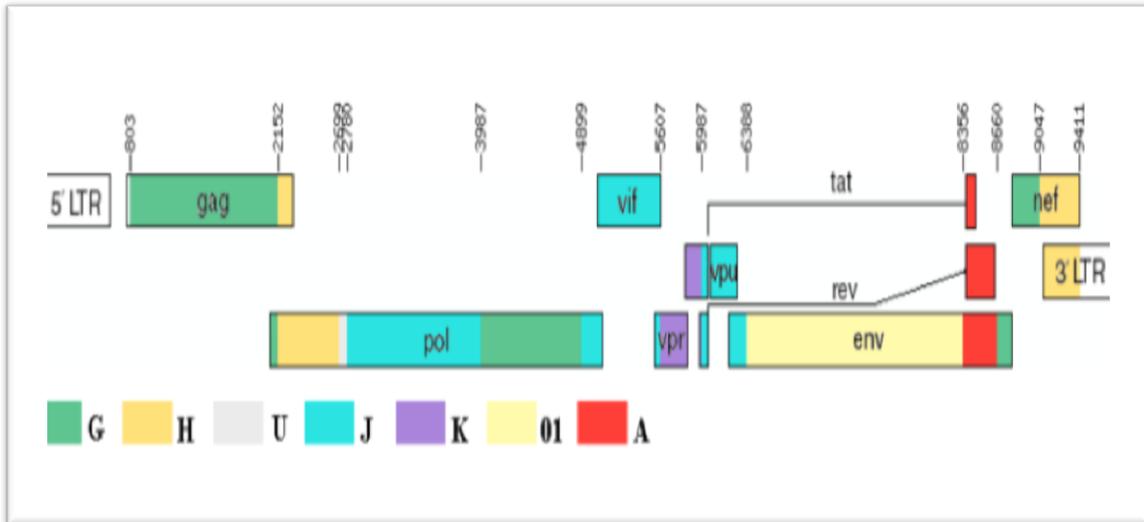


Figure 8: exemple de virus recombinant CRF27_cpx(14)

Ce virus recombinant implique 7 sous-types différents du groupe M (G, H, J, K CRF01_AE, A et U indiquant un sous-type inconnu)

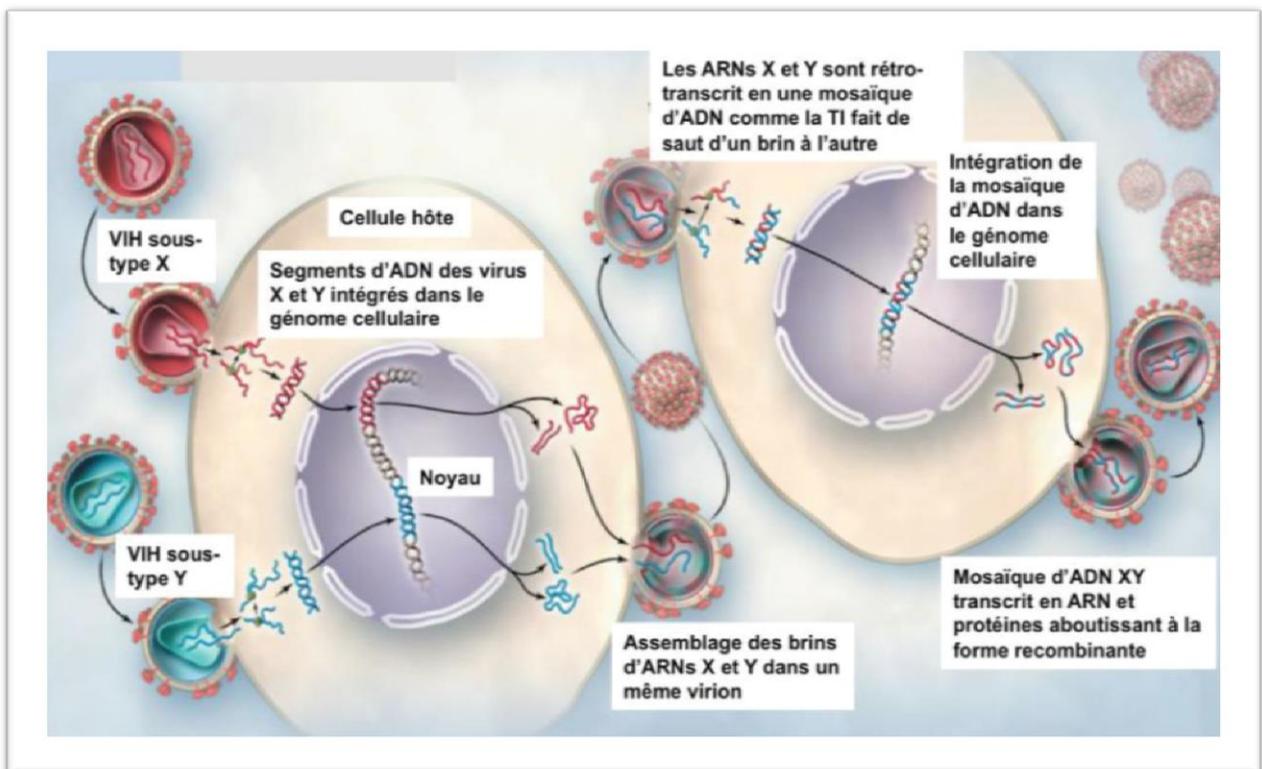


Figure 9: mécanisme de formation d'un virus recombinant dans un contexte de coinfection(37).

1.2.2.2.4 Pression de sélection

Si un grand nombre de mutations entraîne la production de virions défectifs, certaines d'entre elles confèrent un grand pouvoir d'adaptation permettant au virus d'échapper au système immunitaire de son hôte. Seuls les virions les mieux adaptés seront sélectionnés et se multiplieront dans l'organisme. La prise d'un traitement antirétroviral entraînera également une sélection au sein de la population virale en favorisant l'émergence de variants résistants. Ainsi, chez un même individu, le virus est présent sous forme d'une population virale polymorphe avec une multitude de génomes différents ou « variants », c'est ce qu'on appelle une « quasi-espèce ». Chez le sujet récemment infecté, les virus circulants sont génétiquement très homogènes. Cette population virale va évoluer avec un taux global de changement estimé à 1% par an pour le gène *env* et 0,5% par an pour le gène *gag*. Un mélange complexe de variants va apparaître progressivement et évoluer de façon différente et indépendante au niveau des différents tissus et cellules.(51)

1.2.2.3 Conséquences de la diversité génétique

La diversité génétique des VIH a des implications multiples sur plusieurs aspects de la pandémie. Elle peut avoir notamment un impact sur les propriétés biologiques du virus dans le diagnostic, dans les stratégies de développement de vaccins, la transmission de souches résistantes, la pathogénicité virale, la réponse au traitement antirétroviral et l'émergence des mutations de résistance.

1.2.3 Diagnostic biologique de l'infection à VIH

Le diagnostic des infections à VIH repose chez l'adulte sur la détection des anticorps. Cependant, chez un enfant né de mère séropositive, le diagnostic repose sur un diagnostic précoce dans les premiers mois de vie avec la mise en évidence du génome viral, ou de ses composants.

1.2.3.1 Diagnostic sérologique ou indirect

C'est un diagnostic basé sur la détection des anticorps anti-VIH (diagnostic indirect) ou sur la mise en évidence de l'antigène p24. Le dépistage des anticorps anti-VIH s'effectue le plus souvent par des tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ou par des tests de diagnostic rapide (TDR). Les tests ELISA sont capables de dépister à partir d'un sérum ou d'un plasma humain, les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Les TDR sont des tests unitaires qui permettent la détection des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 à partir de différentes

matrices : sérum, plasma, sang total, salive. Leur principe est basé sur celui des techniques ELISA qui consiste en la révélation du complexe.

Le diagnostic sérologique peut également se faire par la technique de Western Blot (WB). C'est une technique de transfert sur membrane de nitrocellulose, après migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide, de protéines d'un lysat viral VIH-1 ou VIH-2. Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives des virus seront reconnues par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 ou VIH-2.

1.2.3.2 Diagnostic direct

Le diagnostic direct consiste en la mise en évidence directe du virus ou d'une de ses protéines constitutives ou du génome viral. Il peut se faire de trois façons :

- Identification du virus par microscopie électronique ou son isolement par culture cellulaire qui se pratique dans les laboratoires hautement spécialisés disposant de toutes les mesures de sécurités requises (laboratoires classés P3 et P4).
- La détection de l'antigène p24 qui est généralement associée aux tests de quatrième génération.
- La détection des acides nucléiques viraux qui se fait par des techniques de biologie moléculaire. Elle consiste en une amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN proviral (ADN intégré) ou par RT-PCR de l'ARN viral plasmatique. C'est une technique onéreuse qui est de plus en plus utilisée pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez les enfants nés de mères séropositives.

Du fait de la présence des anticorps anti-VIH de la mère chez l'enfant âgé de moins de 18 mois, le diagnostic moléculaire reste la technique recommandée pour faire la preuve de l'infection chez celui-ci(52). Aussi, chez l'adulte, lorsque tous les autres paramètres sont encore silencieux (fenêtre sérologique et même la détection de l'antigène p24 par les nouveaux tests rapides) et les ELISA de 4ème génération, la recherche directe de l'ARN ou l'ADN viral permet de confirmer ou non l'infection(53) (figure10).

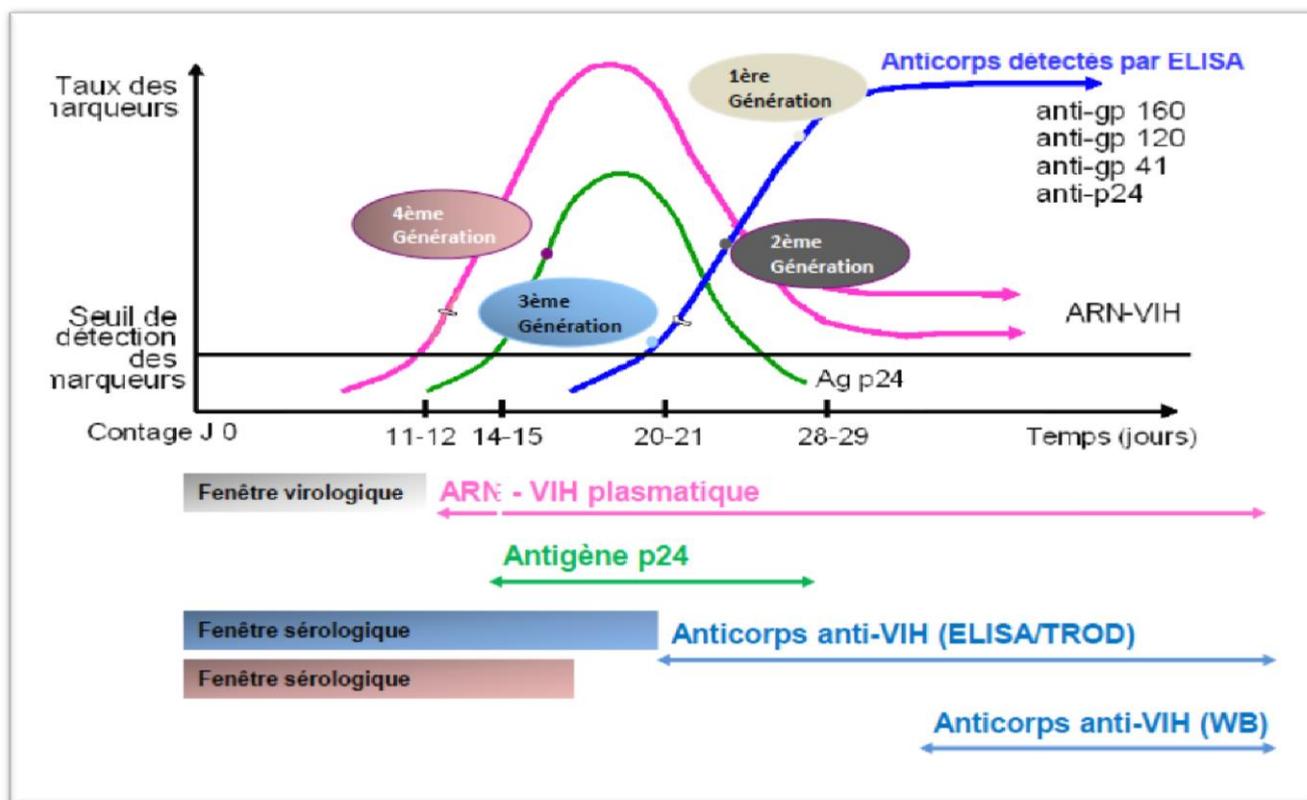


Figure 10: cinétique des marqueurs virologiques au cours de la primo-infection VIH en l'absence de traitement antirétroviral (14).

1.3 Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux

1.3.1 Traitement antirétroviral

1.3.1.1 Objectifs du traitement

L'infection au VIH conduit à la destruction progressive du système immunitaire. L'idée d'une possible éradication semble difficile au vu de l'établissement d'un important réservoir de cellules infectées de manière latente dès la phase précoce de l'infection. L'enjeu principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la réplication virale afin d'éviter la destruction des cellules immunitaires qui conduit à l'immunodépression sévère définissant le stade SIDA. Le traitement antirétroviral permet également de réduire sensiblement le risque de transmission du VIH(54).

La réplication virale doit être réduite au minimum afin de préserver l'efficacité des molécules antirétrovirales dans le temps en évitant au mieux le développement de mutations de résistance. Ainsi, puissance et durabilité sont les deux objectifs du traitement antirétroviral

pour une réduction de la morbidité et de la mortalité via le maintien ou la restauration du système immunitaire défini par un nombre de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500/mm³.

La mesure de la charge virale plasmatique est le meilleur marqueur pour évaluer l'efficacité d'un traitement antirétroviral. L'objectif du traitement est de rendre la charge virale indétectable en quelques mois, en dessous de 50 copies/ml en 6 mois afin de limiter, d'une part, le nombre de lymphocytes T CD4+ infectés qui seraient rapidement détruits et, d'autre part, la sélection de virus résistants qui entraîneraient un rebond de la charge virale plasmatique. L'objectif immunologique est le retour à des valeurs normales de la numération des lymphocytes CD4 ou plus modestement de maintenir les LTCD4+ au-dessus de 500 par mm³ pour éviter la survenue de maladies opportunistes. Enfin, le choix thérapeutique doit prendre en compte l'amélioration de la qualité de vie du patient avec des traitements simples et bien tolérés, afin d'assurer la meilleure adhésion, élément majeur du pronostic virologique (55).

1.3.1.2 Principe du traitement :

Le traitement antirétroviral est un traitement à vie qui nécessite une excellente observance de la part des patients et un suivi régulier par les personnels soignants et par les organisations communautaires. C'est une multithérapie associant généralement (dans les pays du sud) deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques (INTI) de la transcriptase inverse à un inhibiteur non nucléosidique (INNTI) ou un inhibiteur de protéase (IP) et ou un inhibiteur d'intégrase ou d'autres classes thérapeutiques ; les combinaisons thérapeutiques fixes sont privilégiées pour favoriser l'observance et diminuer le coût de la prise en charge. Le traitement prend en compte la prise en charge des co-morbidités, et l'harmonisation des schémas entre les différents groupes d'âges.

1.3.1.3 Les classes thérapeutiques

La connaissance approfondie du cycle de réplication du VIH a permis d'identifier de nombreuses cibles potentielles à des agents thérapeutiques (Figure 11). Plusieurs molécules antirétrovirales ont été approuvées par la Food and Drug Administration pour le traitement de l'infection à VIH/Sida et d'autres sont en cours de développement (56). Ces médicaments sont répartis en six classes et ciblent différentes enzymes et protéines impliquées dans le cycle de réplication virale notamment la TI, la protéase, l'intégrase, la gp41, le corécepteur CCR5.

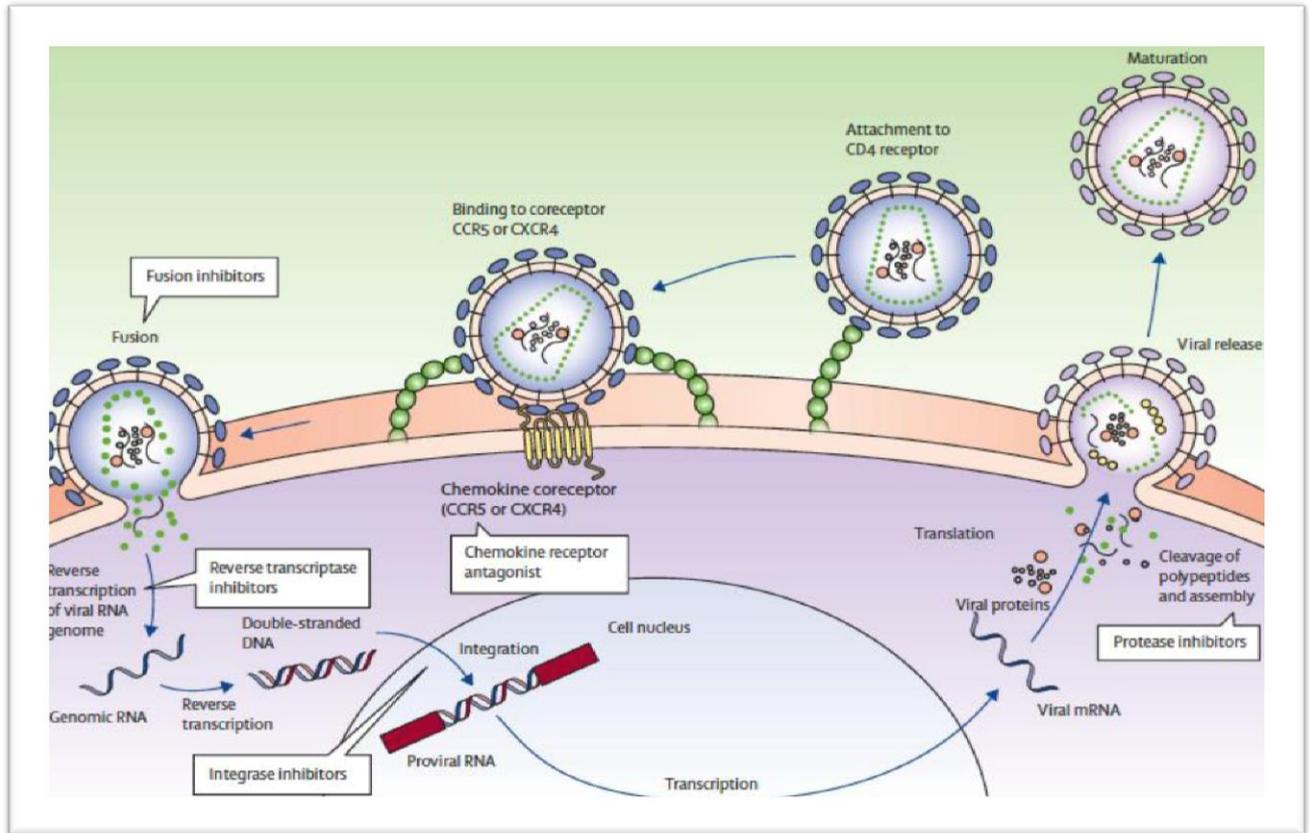


Figure 11: cycle de multiplication du VIH et sites d'action des différentes classes des molécules antirétrovirales(24).

1.3.1.3.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

1.3.1.3.1.1 Les inhibiteurs nucléotidiques /nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

Les INTIs sont des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques composés d'une base purique ou pyrimidique liée à un cycle désoxyribose modifié. Les INTIs sont caractérisés par l'absence du groupement OH en position 3' que contiennent normalement les nucléosides naturels. Ce groupement OH est nécessaire à leur incorporation dans l'ADN naissant. À la différence des analogues nucléosidiques, les analogues nucléotidiques, ont une structure acyclique monophosphorylée.

Ce sont des promédicaments ou prodrugs qui doivent d'abord être transformés à l'intérieur de la cellule pour devenir actifs. Cette transformation consiste à une triple phosphorylation par des kinases cellulaires, ce qui conduit aux INTI-triphosphate qui seront des mauvais substrats

pour la synthèse d'ADN viral. Une fois incorporés dans l'ADN viral, ces composés empêchent toute progression de la synthèse. Ils sont de ce fait appelés terminateurs de chaîne. De plus, la TI n'a pas de système d'identification d'erreurs, de correction et d'élimination de nucléotides incorrects, ce qui fait le succès de ces molécules dans le traitement du VIH. (57)

1.3.1.3.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Les INNTI sont une classe d'antirétroviraux qui cible directement l'enzyme de rétrotranscription ou transcriptase inverse (TI). Ils ont une grande affinité pour une partie hydrophobe spécifique de la TI. En s'approchant vers cette partie, il y a création d'une pochette hydrophobe au niveau de la TI dans laquelle ces molécules vont se loger. Cette poche étant proche du site actif de l'enzyme, les INNTI, en s'y fixant, bloquent la mobilité du domaine catalytique de la TI et empêchent ainsi la réaction de polymérisation de l'ADN. Contrairement aux INTIs, les INNTIs n'ont pas besoin d'être activés. (57)

1.3.1.3.2 Les inhibiteurs de protéase

Les inhibiteurs de protéase empêchent le fonctionnement de la protéase virale. La protéase est formée de deux sous unités qui s'associent et forment le site catalytique. Ainsi, la dimérisation est un processus incontournable pour l'activité de cette enzyme. Les IP agissent comme des faux substrats de l'enzyme. Ils ont une forte affinité avec le site actif de l'enzyme. En se fixant sur ce site, ils bloquent le fonctionnement de l'enzyme et de ce fait, empêchent la production des protéines matures et fonctionnelles du virus. Ils sont classés en premières et deuxièmes générations. La première génération est composée de molécules de nature peptidique mimant le substrat naturel. Elles possèdent une seule activité, celle d'inhiber le site actif de l'enzyme. Par contre, la nouvelle génération comprend des molécules qui sont de nature non peptidiques. Elles ont l'avantage d'être plus flexibles et peuvent adapter leurs interactions en fonction des changements de conformations de la protéase induits souvent par les mutations. Ces molécules possèdent aussi une double activité. En plus d'inhiber le site actif, elles bloquent la dimérisation de l'enzyme nécessaire à la formation de sa forme active. Pour cette raison, elles sont actives sur plusieurs virus résistants aux molécules de la première génération (57).

1.3.1.3.3 Les inhibiteurs d'intégrase

L'intégration de l'ADN du VIH à celle de la cellule se déroule en plusieurs étapes. Ces étapes peuvent être ciblées par les inhibiteurs d'intégrase aboutissant à une inhibition de la

réplication virale. Toutes les molécules utilisées actuellement ont pour mécanisme d'action l'inhibition de l'étape de transfert de brin assurée par l'intégrase. Plusieurs études ont montré que ces molécules inhibent efficacement le transfert de brin à des concentrations de l'ordre de nano molaire(57).

1.3.1.3.4 Les inhibiteurs de CCR5

Les inhibiteurs de CCR5 ciblent essentiellement les corécepteurs CCR5 au niveau de la cellule. La glycoprotéine gp120 interagit avec le CCR5 pour l'entrée du virus. Cette interaction survient après un changement de conformation au niveau du CCR5. Ainsi, les inhibiteurs de CCR5 sont de petites molécules qui se fixent dans une poche transmembranaire de CCR5 et empêchent le changement de conformation. De ce fait, ces molécules bloquent l'interaction de gp120 avec CCR5 et inhibent l'entrée du virus dans la cellule. Cependant, l'inconvénient de ces molécules est qu'elles ne sont actives que sur les virus à tropisme R5. De ce fait, l'utilisation de ces molécules demande préalablement un test de tropisme. (57) De nouvelles molécules ciblant l'entrée du virus dans la cellule hôte sont en cours de développement.

1.3.1.3.5 Les inhibiteurs de fusion

Les inhibiteurs de fusion bloquent la fusion des membranes cellulaires et virales en se fixant sur la région HR1 de la gp41 et empêchant l'interaction de HR2 avec HR1(57).

1.3.1.3.6 Les inhibiteurs de maturation

Les inhibiteurs de maturation agissent à un stade tardif de la production virale. Ils inhibent le clivage du précurseur gag au niveau de la jonction de la protéine de capsid (CA) et la protéine SP1 (p24/p2). Ce clivage est indispensable à la maturation des protéines virales et à l'assemblage des particules virales. Ces molécules se fixent sur pré gag et empêchent le clivage de la protéine. Ceci entraîne la production de virions immatures et non infectieux. Toutefois, la présence de polymorphismes naturels dans le p2 qui diminue considérablement son activité pourrait constituer un obstacle à son développement(57).

1.3.1.4 Protocole thérapeutique (58)

Actuellement au Mali, la stratégie thérapeutique consiste à mettre systématiquement sous traitement tout patient séropositif, dès la découverte du statut de séropositivité. Cependant le protocole ci-dessous est en vigueur.

1.3.1.4.1 Traitement de l'adulte et l'adolescent

Chez l'adulte et l'adolescent le traitement antirétroviral est recommandé dès la découverte de la séropositivité, toute fois le traitement doit indiquer sans attendre aux patients :

- Symptomatiques
- Ayant un taux de CD4 inférieur ou égal à 500 cellules par millimètre cube

1.3.1.4.1.1 Schéma de première ligne pour le VIH-1

Selon les recommandations de l'OMS, en première intention, il est recommandé d'utiliser deux inhibiteurs nucléosidiques /nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) plus un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI). L'option privilégiée de combinaison et les options alternatives en cas d'intolérance sont résumées dans le tableau I

TABLEAU I : SCHEMAS PREFERENTIEL ET ALTERNATIF DE PREMIERE LIGNE POUR LE VIH-1

Schéma préférentiel	Schéma alternatifs
TDF +3TC + EFV	AZT + 3TC + NVP
	AZT + 3TC + EFV
	TDF + 3TC + NVP

1.3.1.4.1.2 Schéma de première ligne pour le vih-2 ; vih-1+vih-2 ; vih-1 groupe O

Le choix thérapeutique exclu les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse qui ne sont pas efficaces sur le VIH-2 ou sur le VIH-1 du groupe O. Les schémas utilisés sont ceux qui associent deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) à un inhibiteur de protéase (IP) boosté ou trois INTIs.

Les traitements préférentiels et alternatifs figurent dans le tableau II

Tableau II :schémapréférentiel et alternatifs de première ligne pour le vih-2 ; vih-1+vih-2 ; vih-1 groupe O

Schéma préférentiel	Schéma alternatifs
TDF + 3TC +LPV/r	AZT+3TC+ATV/r
	AZT+3TC+ABC
	TDF+3TC+ATV/r

1.3.1.4.1.3 Traitement de deuxième ligne

Il est indiqué chez les patients en échec thérapeutique (échec clinique, immunologique et virologique) ; chez ces types de patients il est recommandé de renforcer l'observance avant d'envisager tout changement de ligne thérapeutique.

Le schéma recommandé est l'association de deux INTIs et un IP boosté. Le schéma de 2è ligne doit inclure au moins deux nouvelles molécules dont l'une issue d'une famille différente des familles utilisées en première ligne. La Lamivudine doit être toujours maintenue en 2è ligne. Les traitements préférentiels et alternatifs sont résumés dans le tableau III

TABLEAU III : SCHEMAS PREFERENTIEL ET ALTERNATIFS DE DEUXIEME LIGNE POUR LE VIH-1

Schéma préférentiel	Schéma alternatifs
AZT +3TC +LPV/r	TDF + 3TC + LPV/r
	AZT + 3TC + ATV/r
	TDF + 3TC + ATV/r

1.3.1.4.1.4 Schéma de troisième ligne

Les patients en échec virologique de 2è ligne doivent être gérés en fonction du résultat de test génotypique de résistance. Cependant, en cas de génotype non disponible les schémas figurant dans le tableau IV peuvent être utilisés en 3è ligne :

Tableau IV : schéma préférentiel et alternatifs de troisième ligne pour le VIH-1

Schéma préférentiel	Schéma alternatifs
DRV/r +RAL +ABC	DRV/r + DTG + 3TC
	DRV/r + DTG + ABC
	DRV/r + RAL + 3TC

1.3.1.4.2 Traitement de l'enfant

Le traitement ARV doit être initié chez tout enfant infecté quel que soit l'âge, le stade clinique et le nombre de CD4. Pour les nouveau-nés ayant une première PCR positive, le traitement doit être initié en attendant la confirmation. Ce traitement sera arrêté en cas d'infirmité.

1.3.1.4.2.1 Schémas thérapeutiques

Chez les enfants infectés, âgés de 3 ans et plus, l'EFV est l'INNTI privilégié pour le TAR de première intention et la NVP est l'option de remplacement. Pour ceux qui sont âgés de 3 ans et plus avec moins de 10 ans pesant moins de 35 kg, la base des INTIs du schéma thérapeutique doit être constituée par ordre de préférence, des associations ABC + 3TC, AZT ou TDF + 3TC ou FTC. D'autre part, pour les enfants de moins de 3 ans, un schéma thérapeutique à base de LPV/r doit être utilisé comme TAR de première intention, qu'il ait ou non été exposé aux INNTI. Dans le scénario où la LPV/r ne peut être utilisé il est recommandé d'utiliser un schéma à base de NVP.

1.3.1.4.3 Traitement de la femme enceinte dans le cadre de la prévention de la transmission mère enfant PTME

Les programmes de prévention de la transmission mère enfant du VIH (PTME) encouragent la mise sous TAR précoce pour améliorer la santé des femmes enceintes et prévenir la transmission du virus à leurs enfants et également à leurs conjoints.

Une trithérapie doit être mise en route chez toute femme vivant avec le VIH enceinte ou allaitante au sein et doit être poursuivie au moins pendant toute la période où il existe un risque de transmission de la mère à l'enfant. Aussi, pour leur propre santé, le TAR doit être mise en route pour toute femme vivant avec le VIH enceinte ou allaitante, remplissant les critères de mise sous traitement. L'association en dose fixe et en prise unique quotidienne de **TDF + 3TC + EFV** est celle recommandée et s'applique aussi bien pour le traitement à vie et/ou dans le cas d'une PTME(52).

A la suite d'un échec thérapeutique de première intention, le traitement de deuxième intention chez la femme infectée enceinte et allaitante reste le même que celui chez l'adulte et l'adolescent.

Un nourrisson né d'une mère séropositive et allaité au sein doit recevoir une prophylaxie par prise quotidienne de **NVP sirop (2mg/kg/jr)** à débiter dès l'accouchement et continuer pendant six semaines (52). En cas de toxicité ou d'indisponibilité de la NVP, utiliser de préférence **3TC sirop(2mg/kg/jr)**.

Si le nourrisson est sous-alimentation artificielle, il doit prendre **AZT + NVP sirop(2mg/kg/jr)** à débiter dès l'accouchement et continuer pendant six semaines.

Si la mère n'a pas reçu d'ARV pendant la naissance, il est préférable de donner **AZT + 3TC + NVP** pendant 1 mois ou prolonger la première prophylaxie à 12 semaines.

1.3.2 Résistance aux antirétroviraux

1.3.2.1 Définition et classification

La résistance aux antirétroviraux est liée à la sélection de mutations dans les gènes codant pour les protéines cibles des ARV en présence de ces traitements et une réplication virale persistante. Elle est classée en deux types :

- La résistance primaire qui correspond à la transmission d'une souche virale résistante, elle s'observe chez un patient naïf de tout traitement antirétroviral, elle peut être naturelle ou transmise lors de l'infection.
- La résistance acquise ou secondaire correspondant à la sélection d'un virus résistant sous traitement non-optimal, elle apparaît chez un patient VIH en échec thérapeutique. La résistance croisée qui apparaît lorsqu'une ou plusieurs mutations sélectionnées par un antirétroviral causent aussi des résistances à d'autres molécules antirétrovirales de la même classe, peut-être secondaire à une résistance transmise ou acquise.

- Il existe également une résistance naturelle du VIH-2 à certaines classes thérapeutiques comme les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).

1.3.2.2 Mutations de résistance

Les mutations sont des changements d'acide aminé dans le gène du virus par rapport aux acides aminés de la souche sauvage pris comme référence. Elles sont nommées en indiquant la position de l'acide aminé précédée de la lettre correspondant au type sauvage et suivi de la lettre de l'acide aminé qui a pris la place. Par exemple pour la mutation M184V, la méthionine (M) est changée pour la valine (V) en position 184. Toutes les mutations ne sont pas associées à une résistance aux traitements. Certaines mutations situées sur les gènes qui codent pour les protéines ciblées par les traitements vont avoir plus d'impact sur la résistance que celles situées en dehors de ces gènes par exemple. D'autres mutations sont observées chez des souches comparées à une référence sans être forcément associées à une résistance. Dans ce cas on parle de polymorphisme.

En ce qui concerne les mutations de résistance, leur sélection dépend : de facteurs pharmacologiques, de la puissance du traitement antiviral et de la « barrière génétique » du virus vis-à-vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre de mutations virales qui permet au virus d'être résistant. Ainsi nous avons deux types de mutations de résistance : les mutations majeures dont l'unique présence induit un niveau de résistance élevé à un médicament donné et les mutations mineures pour lesquelles l'accumulation de plusieurs substitutions est nécessaire pour observer un phénotype de résistance élevé.

1.3.2.3 Résistance aux différentes classes d'ARV

1.3.2.3.1 Résistance aux INTIs

Deux grands mécanismes sont impliqués dans la résistance aux INTIs : le mécanisme de diminution d'incorporation de l'inhibiteur ou « *discrimination* » et le mécanisme d'excision (59).

- **Diminution d'incorporation de l'inhibiteur**

Le mécanisme de discrimination est basé sur une diminution de l'efficacité d'incorporation des INTIs. Les mutations les plus souvent impliquées dans ce mécanisme sont la M184V et le complexe de mutation Q151M. La M184V entraîne un haut niveau de résistance à la lamivudine (3TC). Le complexe de mutation Q151M est composé d'un groupe de mutations

dont A62V, V75I, F77L et F116Y dans lequel la Q151M apparait le premier. Ces mutations sont sélectionnées en cas d'échec aux INTI, préférentiellement le d4T, le ddI, l'AZT, ddC, et l'ABC(60).

- **Excision des analogues incorporés**

Plusieurs mutations agissent par ce mécanisme pour induire une résistance aux INTIs comme les « *thymidine-associated mutations* » (TAM) ainsi que l'insertion en position 69.

Les TAM entraînent la résistance à tous les INTIs, mais l'efficacité d'excision est variable selon les INTIs. Il a été montré que l'excision est plus efficace avec l'AZT et de façon décroissante, d4T, ddC, ABC, 3TC, ddI et TDF(61), ce qui explique en partie les résistances croisées entre les INTIs. En effet, il existe deux voies TAM sélectionnées par les INTIs. La voie TAM-1 composé de mutation M41L, L210W et T215Y et la voie TAM-2 avec les mutations D67N, K70R et K219E/Q et T215F. Il a été montré que la voie TAM1 entraine une résistance croisée in vivo entre ABC et TDF(62).

L'insertion en position 69 entraine aussi une résistance à l'ensemble des INTIs. Elle peut utiliser les deux mécanismes : en plus de diminuer l'incorporation, elle entraine aussi une augmentation de l'excision des INTIs déjà incorporés(63).

Mutations de résistance par inhibiteur nucléosidique majeur de la RT (INTI)

	Discriminatory Mutations					Thymidine Analog Mutations (TAMs)						MDR Mutations	
	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
Consensi	M	K	K	L	Y	M	D	K	litres	T	K	T	Q
3TC	VI	R										Ins	M
FTC	VI	R										Ins	M
abc	VI	R	E	VI	F	L			W	FY		Ins	M
DDI	VI	R	E	VI		L			W	FY		Ins	M
TDF	***	R	E		F	L		R	W	FY		Ins	M
D4T	***	R	E			L	N	R	W	FY	QE	Ins	M
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	FY	QE	Ins	M

Figure 12 : mutations de résistance associées aux INTI selon IP selon HIVdb version 8.7 (dernière mise à jour du 19-10-2018)

1.3.2.3.2 Résistance aux INNTIs

Rappelons que les INNTIs se fixent dans une poche hydrophobe située au niveau de la TI. Les changements au niveau des acides aminés formant cette poche peuvent affecter la bonne fixation des INNTIs entraînant une diminution de l'affinité à ces molécules et la résistance.

Quatre groupes essentiels de mutations sont impliqués à des degrés divers dans la résistance aux INNTIs(64).Le premier groupe est composé d'Y181C et Y188C/L/H, qui confèrent respectivement une forte résistance à la nevirapine et une sensibilité réduite à l'EFV. Le deuxième concerne la mutation K103N conférant une résistance croisée aux INNTIs. Le troisième groupe est constitué de mutations L100I qui induit une résistance à tous les INNTIs expté l'etravirine, V106AM et V108I. Enfin le dernier comporte les mutations K101E et E138K. D'autres mutations moins fréquentes telles que P225H ainsi M230L et P236 sont observées dans la résistance aux INNTIs plus précisément à l'EFV et la delavirdine et sont regroupées en un groupe à part(64).

Mutations majeures de la résistance à l'inhibiteur non nucléosidique de la RT (INNTI)

	100	101	103	106	138	181	188	190	230
Consensus	I	K	K	V	E	Y	Y	G	M
DOR	je	EP		A M I		CIV	L HC	S E	L
EFV	je	E P	NS	Un m		CIV	LC H	Une SE	L
ETR	je	E P			AGKQ	C IV	L	AS E	L
NVP	je	EP	NS	UN M		CIV	LCH	ASE	L
RPV	je	E P			AG K Q	C IV	L	AS E	L

Figure 13 : mutations de résistance associées aux INNTI selon HIVdb version 8.7 (dernière mise à jour du 19-10-2018)

1.3.2.3.3 Résistance aux IP

Les mutations au niveau du site actif de la protéase empêchent la bonne fixation des inhibiteurs. Ce mécanisme peut être double : soit les mutations agrandissent le site de fixation

au niveau de la protéase (65), soit elles influencent directement la fixation de l'inhibiteur par la disparition des liaisons auparavant utilisées par les différentes molécules. Dans les deux cas, cela se traduit par une diminution de l'affinité pour la protéase et une inefficacité des molécules inhibitrices. En général, une seule mutation n'est pas suffisante pour induire la résistance aux inhibiteurs de protéase. L'accumulation de plusieurs mutations est nécessaire pour l'apparition de la résistance. Toutefois, certaines mutations dites majeures sont importantes pour l'émergence de la résistance. C'est le cas des mutations D30N, I50V, V82A, et L90M, qui induisent respectivement une résistance au nelfinavir, à l'amprenavir, au ritonavir et au saquinavir. A ces mutations s'associent d'autres mutations appelées secondaires qui appuient l'effet des mutations majeures.

Mutations de résistance par inhibiteur de protéase majeur (PI)

	30	32	33	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
Consensus	D	V	I	M	je	G	je	je	L	V	I	N	litres
VTT / r		je	F	IL	V	VM	L	VTALM		ATFS	V	S	M
DRV / r		je	F	Virginie			V	LM	V	F	V		
FPV / r		je	F	IL	V A		V	VTA LM	V	ATF F	V		M
IDV / r		je		IL	V			VTA LM	V	AFTS	V	S	M
LPV / r		je	F	IL	V A	VM	V	VTALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		F	IL	V	VM		VTALM		AFTS	V	DS	M
SQV / r						VM		VTA LM		A	V	S	M
TPV / r		je	F	IL	Virginie			VAM		TL	V		

Figure 14: mutations majeures de résistance associées aux IP selon HIVdb version 8.7 (dernière mise à jour du 19-10-2018)

1.3.2.3.4 Résistance aux inhibiteurs d'intégrase

L'intégrase est responsable de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Les inhibiteurs d'intégrase se fixent sur le site actif de l'enzyme et l'empêchent de fonctionner correctement. Ainsi, toute mutation au niveau de ces résidus pourrait modifier l'affinité de

l'enzyme pour les inhibiteurs et entraver leur bonne fixation, empêchant donc leur fonction d'inhibition.

Les mutations N155H et Q148R/H/K ont été identifiées comme la signature de la résistance à la raltégravir et à l'élvitégravir (66). Toutefois, la mutation Y143R/C est responsable d'une forte réduction de la susceptibilité aux inhibiteurs d'intégrase, surtout au raltégravir(67).

Par ailleurs, plusieurs mutations secondaires telles que L74M, T97A, E138K, G140/S/A/C, E92A/Q, G163K/R, V151I et D232N ont été observées chez les patients en échec. Ces mutations ont peu ou pas d'effet en absence des deux mutations majeures, N155H et Q148R/H/K. Cependant, les mutations E92Q et S147G sont particulièrement impliquées dans la résistance à l'élvitégravir(67). Deux voies de résistance ont été observées avec les mutations secondaires. La première concerne les mutations L74M, E138K et G140A/S en association avec la mutation majeure Q148R/H/K. La seconde voie regroupe les mutations L74M, E92A/Q, T97A, Y143H/C, V151I, G163K/R et D232N en association avec la mutation majeure N155H(68). Une équipe française a récemment publié une étude sur la présence de mutations en dehors de l'intégrase et qui impacteraient les molécules de cette classe. (Malet I et al)

Mutations de résistance par inhibiteur majeur de l'intégrase (INST1)

Consensus	66	92	118	138	140	143	147	148	155	263
	T	e	g	E	g	Y	S	Q	N	R
Bictegravir (BIC)	K	Q	R	KAT	SAC			HRK	H	K
Dolutégravir (DTG)	K	Q	R	KAT	SAC			HRK	H	K
Elvitégravir (EVG)	AIK	Q	R	KAT	SAC		g	HRK	H	K
Raltégravir (RAL)	AI K	Q	R	KAT	SAC	RCH		HRK	H	K

Figure 15 : mutations de résistance aux Inhibiteurs d'intégrase selon HIVdb version 8.7 (dernière mise à jour du 19-10-2018)

1.3.2.3.5 Résistance aux inhibiteurs de corécepteur CCR5

La résistance aux inhibiteurs de CCR5 s'effectue selon deux voies distinctes : Le changement de corécepteurs et la sélection des mutations de résistance qui rendent possible l'utilisation de CCR5 malgré la présence des inhibiteurs.

- **Changement de corécepteur**

La boucle V3 de la glycoprotéine gp 120 est le principal déterminant de la préférence d'utilisation de l'un ou l'autre des corécepteurs(69). D'ailleurs, certains acides aminés de la boucle V3 sont fortement utilisés pour prédire le tropisme connu sous le nom de la règle 11/24/25(70). Cette règle stipule qu'une charge positive de ces résidus détermine l'utilisation de corécepteur CXCR4, dans le cas contraire (résidus négatifs) c'est le corécepteur CCR5 qui est utilisé. Ainsi, toute mutation chez les virus rendant ces résidus positifs conduit à l'utilisation des corécepteurs CXCR4 alors qu'ils utilisaient précédemment CCR5. Ce phénomène est connu sous le nom de « switch ».

- **Sélection des mutations rendant possible l'utilisation de CCR5 sous traitement**

La deuxième voie de résistance est l'apparition des mutations qui rendent possible l'utilisation de CCR5 malgré la présence de l'inhibiteur. Deux sites distincts sont impliqués dans la liaison de gp120 avec CCR5, le « bridging sheet » et la boucle V3. Le bridging sheet se lie à la partie N-terminal de CCR5 tandis que la boucle V3 établit une liaison avec le domaine ECL2. Il a été montré que les inhibiteurs de CCR5 modifient surtout la configuration d'ECL2(71). Ainsi, le mécanisme de résistance avancé suite à ce constat est que le virus utiliserait moins l'ECL2 et devient plus dépendant de la liaison N-terminale de CCR5 pour l'infection. Ainsi, pour ces virus résistants l'interaction de V3 avec ECL2 n'est plus nécessaire pour l'infection(72). Cette hypothèse est soutenue par le fait que le VIH-1 et VIH-2 débarrassés de la boucle V3 sont capables d'infecter les cellules et de se répliquer(73, 74).Plusieurs mutations sont impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de CCR5.

1.3.2.3.6 Résistance aux inhibiteurs de fusion (T20)

Le mécanisme de résistance à l'enfuvirtide est lié à l'apparition de mutations dans la portion HR1 de la gp41 au niveau des acides aminés 36 à 45 (75). Ces mutations empêchent la fixation de l'enfuvirtide et conduisent donc à la résistance à cette molécule. Plusieurs autres

mutations toujours dans la portion HR1 comme Q40H/K/P/T, N42D/T, N43D/K/S, N42T+N43S, L44M et L45M ont été observées comme étant associées à la résistance à l'enfuvirtide(66).

MUTATIONS IN THE ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS

	G	I	V	Q	Q	N	N
Enfuvirtide [®]	36	37	38	39	40	42	43
	D	V	A	R	H	T	D
	S		M				
			E				
Maraviroc [®]	See User Note						

Figure 16: mutations de résistance à l'enfuvirtide selon «international AIDS society» (IAS) 2017

1.3.2.4 Les tests de résistance

De nos jours, deux méthodes sont employées pour évaluer la résistance du VIH aux différents médicaments : les tests phénotypiques et génotypiques.

- **Les tests phénotypiques**

Ils reposent sur la détermination de la concentration de produit actif nécessaire pour inhiber la réplication virale de 50 % ou 90 %. S'agissant de la résistance phénotypique, elle est mesurée en comparant la valeur de la concentration inhibitrice (CI) des isolats viraux testés à celle d'isolats de souche sauvage. Une valeur élevée de la CI reflète cependant une perte de sensibilité du virus vis-à-vis de tel ou tel agent antirétroviral(76).

- **Les tests génotypiques**

Les tests génotypiques ou tests de génotypage ciblent les régions du génome du VIH qui codent les enzymes et protéines virales essentielles à la réplication du virus ; ces régions sont les cibles préférentielles des molécules antirétrovirales. Les tests génotypiques sont des tests basés sur le séquençage classique selon la méthode de Sanger(77). Leur but est de rechercher dans le gène correspondant à la cible de l'antirétroviral, des mutations connues comme associées à la résistance. L'ARN viral plasmatique extrait est d'abord rétrotranscrit en ADN puis selon la région du génome qui est ciblée, les gènes de la TI et ou de la protéase, de

l'intégrase, de la boucle V3 ou de la gp41 sont amplifiés spécifiquement par PCR. Les produits de PCR sont directement séquencés au moyen d'amorces spécifiques et les séquences obtenues subissent une électrophorèse sur des séquenceurs automatiques. Il s'agit de déterminer si les codons sont de type sauvage ou mutés ou s'il s'agit d'insertion d'acides aminés par rapport à une séquence de référence. Les avantages de cette technique sont la rapidité d'exécution, la reproductibilité et la standardisation. L'interprétation s'appuie sur des règles ou algorithmes d'interprétation empiriques. La construction d'algorithmes d'interprétation, mis à jour régulièrement, permet de traduire le profil de mutation observé en « sensible », « résistance possible » ou « résistance » pour chaque molécule. Pour l'analyse des séquences, outre les outils d'analyse et d'interprétation accompagnant les trousseaux commerciaux de tests de résistance, d'autres algorithmes cliniquement validés et régulièrement mis à jour sont disponibles en ligne. Ce sont des algorithmes d'accès libre, parmi lesquels, les plus utilisés sont les algorithmes du groupe AC11 de l'ANRS [(www.hivfrenchresistance.org/)], de l'Université de Stanford [(<http://hivdb.stanford.edu>)], et Rega [(<http://www.rega.kuleuven.be/cev/fileadmin/algorithms/Rega>)].

2. Matériel et Méthodes

2.1 Méthodes

2.1.1 Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée à l'Institut National de Recherche en santé publique(INRSP) plus précisément à l'unité de biologie moléculaire VIH.

2.1.1.1 Description de l'INRSP

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P– RM du 28 Février 2006.

Missions :

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique, notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, de l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée à la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, de la toxicologie médicale et expérimentale, de la bromatologie, de la génétique, de la socio économie, de la médecine et pharmacopée traditionnelle ;
- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;
- Assurer la mise au point et la formulation des médicaments traditionnels améliorés ;
- Assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
- Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;
- Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

Composition :

- L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :
- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;

- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR).

Le Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR) se compose de six services :

- Sérologie-Immunologie ;
- **Bactériologie-virologie ;**
- Hématologie biologique ;
- Biochimie clinique ;
- Parasitologie ;
- Cytogénétique.

En outre, l'institut dispose des centres de formation en zone rurale qui sont :

- Le centre de Sélingué ;
- Le centre de Kolokani ;
- Le Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara (CRMT).

2.1.2 Type et période de l'étude

Il s'agissait d'une étude rétrospective transversale à visée descriptive quia porté sur des DBS collectés entre 2012 et 2013.

2.1.3 Population d'étude

Il s'agissait des nouveau-nés de mères séropositives au VIH-1 dont les Dried Blood spot (DBS) ont été collectés pendant la période concernée.

2.1.4 Taille de l'échantillon

L'échantillonnage a porté sur 108 DBS testés positif au VIH-1 par la méthode PCR dans le cadre de diagnostic précoce et collectés entre 2012 et 2013.

2.1.5 Critères d'inclusion

Ontété inclus dans l'étude tous les nouveau-nés de mères séropositives au VIH-1 :

- Dont les échantillons ont été collectés pendant la période d'étude,
- Qui ont eu des PCR positives au VIH-1.

2.1.6 Critères de non inclusion

Ont été exclus tous les DBS de nouveau-nés ne remplissant pas les critères d'inclusion.

2.2 Matériels

2.2.1 Matériels Biologiques

Le sang prélevé sur papier buvard et séché chez des nouveau-nés de mères séropositives au VIH-1 a été notre matériel biologique.

2.2.2 Matériels de laboratoire

Les matériels utilisés pour l'extraction d'ADN proviral, l'amplification génique, la révélation des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose, la purification des produits PCR révélés, le séquençage, la purification et la révélation des produits séquencés par électrophorèse sur capillaire sont listés dans l'annexe. Nous avons utilisé comme matériels clefs : un thermocycleur classique 5700 pour amplifier, un dispositif d'électrophorèse (cuve, support du gel, peignes, générateur, transilluminateur UV) pour révéler les produits PCR et un séquenceur ABI 3500 genetic analyseur pour révéler les produits séquencés

2.3 Techniques utilisées

2.3.1 Prélèvement et stockage des échantillons

Des échantillons de sang total ont été prélevés sur papier buvard (DBS) et testé par la méthode PCR, pour le diagnostic précoce du VIH-1. Ceux qui sont sorti positifs ont été triés et stockés au congélateur à une température de – 80 °C.

2.3.2 Extraction de l'ADN proviral

Pour obtenir l'ADN proviral à partir des échantillons de DBS, nous avons procédé à une extraction chimique avec le kit d'extraction QUIAGEN.

Trois spots de 6 mm ont été découpés à partir des DBS et placés dans un tube de microcentrifugation pour tous les échantillons. Les étapes de lyse des cellules, précipitation des protéines indésirables, capture des acides nucléiques, lavages et élution ont été réalisées pour chaque échantillon selon le protocole d'extraction du kit QIAGEN (voir annexe). Les extraits d'ADN ont été conservés au congélateur à -20°C ou directement amplifiés.

2.3.3 Réaction de PCR

2.3.3.1 Principe de la PCR

La PCR ou Polymerase Chain reaction est le chef de file des méthodes d'amplification génique.

L'amplification génique, permet de multiplier de manière exponentielle un fragment d'ADN cible.

Pour le génotypage de résistance du VIH-1, la PCR met en évidence des régions ciblées du génome viral, intégrées au génome cellulaire, par amplification à l'aide d'une enzyme ADN polymérase thermorésistante (*Taq polymérase*). Les régions sont celles qui codent pour les enzymes ou protéines impliquées dans le cycle de réplication du VIH.

La technique de PCR, est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour cela, des segments d'acides nucléiques connus, des oligonucléotides, vont servir d'amorces et s'associer à la matrice par complémentarité pour initier le processus.

La réaction de PCR peut se décomposer en plusieurs étapes présentées ci-dessous :

- **La dénaturation thermique** ($\approx 95^{\circ}\text{C}$)

Les deux brins d'ADN sont séparés en ADN simple brin par la chaleur qui rompt les liaisons hydrogènes. Ces brins séparés, vont servir de matrice au cours des cycles d'amplification.

- **L'hybridation des amorces** ($\approx 55^{\circ}\text{C}$)

Les deux amorces (sens et antisens, chacune complémentaire d'un des brins), s'hybrident à tout ADN simple brin qui comporte la séquence complémentaire. Elles vont déterminer les bornes de la séquence à amplifier.

- **L'élongation (ou extension) des amorces** ($\approx 72^{\circ}\text{C}$)

L'enzyme ADN polymérase (*Taq polymérase*) incorpore des désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) complémentaires de la séquence de la matrice, pour allonger l'amorce à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue toujours dans le sens 5'3'.

Ces trois étapes sont répétées de manière cyclique au cours du processus d'amplification. A chaque cycle, le nombre de copies de la séquence cible est doublé. Ainsi, l'amplification de la séquence cible est exponentielle.

A la fin de la réaction, les produits de PCR sont refroidis à 4°C pour conserver les amplicons.

2.3.3.2 Technique utilisée

Nous avons procédé à l'amplification de l'extrait d'ADN obtenu, par deux PCR successives. Après une première PCR classique réalisée avec un couple d'amorces externes, le produit a été ré-amplifié au cours d'une seconde PCR dite PCR nichée en utilisant un autre couple d'amorces internes. La particularité de ces amorces, est qu'elles s'hybrident à une partie

interne de la séquence précédemment amplifiée d'où le terme de « PCR nichée ». L'intérêt de cette méthode est d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction.

Nos régions d'intérêt étaient les gènes codants pour les protéines suivantes : la protéase (Prot), la reverse transcriptase (RT), l'intégrase (int).

2.3.3.2.1 Amorces utilisées

Les amorces étaient celles décrites par l'ANRS. Un couple d'amorces avec un brin sens et un brin anti-sens a été utilisé pour chacun des trois gènes et pour chacune des deux PCR. Chaque couple porte le nom de « *outer* » pour la première PCR et « *inner* » pour la PCR nichée. Elles étaient sous forme lyophilisée, une quantité précise d'eau de qualité PCR a été ajoutée à chacune d'entre elle pour les reconstituer. Des solutions filles d'amorces ont été préparées à partir de la solution mère par dilution afin de diminuer les concentrations et limiter les phases de congélation/décongélation pouvant altérer la qualité des amorces. Toutes ces solutions ont été conservées à -20°C. Les amorces externes étaient concentrées à 20 µM et les internes à 10 µM. Elles sont listées dans les tableaux V et VI

Tableau V :liste des amorces externes utilisées pour amplifier les trois gènes de réplication du VIH par PCR

Amorces	Séquences nucléotiques
RT	MJ35'-AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA-3'
	MJ45'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'
Prot	5P' 15'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'
	3P' 1 5'-GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG-3'
INT	INPS1 5 'TAG TAG CCA GCT GTG ATA AAT GTC- 3'
	INPR85'-TTC CAT GTT CTA ATC CTC ATC CTG-3 '

Tableau VI: liste des amorces internes utilisées pour amplifier les trois gènes de réplication du VIH par PCR

	Amorces	Séquences nucléotiques
RT	A35	5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'
	NE35	5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'
Prot	5'P2	5'- TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'
	3'P25'	5'- AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC-3'
INT	INPS3	5'- GAA GCC ATG CAT GGA CAA G- 3'
	INPR9	5'-ATC CTC ATC CTG TCT ACT TGC C3'

2.3.3.2.2 Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel été préparé dans une salle de mix et sous une hotte dans des tubes de micro centrifugation de 1.5 ml. La quantité de mix à réaliser a été calculée pour le nombre d'extrait à amplifier plus un, pour être sûr d'avoir une quantité suffisante à distribuer. Un tube a été utilisé pour chacun des trois gènes recherchés. Le mix a été préparé en ajoutant les réactifs les uns après les autres : les dNTPs, le couple d'amorces sens/anti-sens, le tampon, l'eau PPI, le chlorure de magnésium et l'enzyme (*Taq polymerase*) qui est introduite en dernier. Le mélange réactionnel a été ensuite redistribué dans les puits d'une plaque PCR. L'ADN à amplifier a été ajouté par la suite au mélange réactionnel pour la PCR classique, en ce qui concerne la PCR nichée le produit amplifié de 1^{er} tour a servi de matrice, il a donc été ajouté au mélange réactionnel. La réaction PCR a été réalisée dans des plaques de 96 puits, pour un volume réactionnel de 50 µl pour la PCR classique et 100 µl pour la PCR nichée. Les compositions des deux mix sont données respectivement dans les tableaux VII et VIII.

Tableau VII : composition du mélange réactionnel pour la PCR classique

Réactifs	Concentration	Volume par puits (µl)
----------	---------------	-----------------------

DNTPs	5 µM	5
Amorce sens	20 µM	1
Amorce anti sens	20 µM	1
Mgcl2	25 µM	2.5
Tampon	10X	8
H2O	NA	12.25
Taq polymérase	5U/µl	0.25
Matrice	–	20
Volume final par puits	–	50

Tableau VIII :composition du mélange réactionnel pour la PCR nichée.

Réactifs	Concentration	Volume par puits (µl)
DNTPs	5 µM	5
Amorce sens	10 µM	1
Amorce anti sens	10 µM	1
MgCl₂	25 µM	2.5
Tampon	10X	8
H₂O	NA	72.25
Taq polymérase	5U/µl	0.25
Matrice	–	10
Volume final par puits	–	100

2.3.3.2.3 Programmation du thermocycleur

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur programmé manuellement dont les programmes et profils de température sont présentés dans les tableaux IX et X.

Tableau IX : programme du thermocycleur pour la PCR classique

Température	Temps	Nombres de cycles	Etape
94°C	5min	1	Dénaturation
94°C	30 sec		Dénaturation
55°C	30 sec	45	Hybridation
68°C	1 min		Elongation
68 °C	7 min	1	Elongation
4°C		infini	1
refroidissement			

Tableau X : programme du thermocycleur pour la PCR nichée

Température	Temps	Nombres de cycles	Etape
94°C	5min	1	Dénaturation
94°C	30 sec		Dénaturation
55°C	30 sec	45	Hybridation
72°C	1 min 30sec		Elongation
72 °C	7 min	1	Elongation
4°C		infini	1
refroidissement			

2.3.3.2.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier l'efficacité de l'amplification, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été réalisée à partir des produits de la deuxième PCR (PCR nichée). Il s'agit d'une technique de séparation des fragments d'acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. Elle va permettre d'identifier si les fragments d'ADN attendus ont été amplifiés et si leur taille est la bonne.

- *Préparation du gel*

La première étape consistait à préparer le gel. Pour fabriquer un gel de 1%, 150mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE) à 0,5X ont été mélangés dans un erlenmeyer avec 1.5g de poudre d'agarose pesé au préalable. Le mélange a été chauffé au four à micro-onde jusqu'à obtention d'une solution limpide. Après refroidissement de cette solution, 5µl de bromure d'ethidium (BET) ont été ajoutés. Le BET, est une molécule qui s'intercale entre les bases de l'ADN double brin et dont l'exposition à un rayonnement Ultraviolet (UV) la fait fluorescer et

permet de repérer les fragments d'ADN qui ont migré. Le gel a été ensuite coulé dans une cuve composée d'un support et de peignes mis en place pour former les puits. La solution refroidit pendant environ 30 minutes et le gel se forme.

- ***Migration électrophorétique***

Ensuite, vient l'étape de la migration. Le gel sur son support a été immergé dans une cuve à électrophorèse contenant le tampon TBE à 1X. Dans des tubes de 0.5 ml, 2.5µL de produits de la PCR nichée ont été déposés et mélangés avec 2.5µL de bleu de bromophénol. Ce produit contient du glycérol qui empêche le mélange entre l'échantillon et le tampon lors du dépôt dans les puits du gel. Il permet aussi de visualiser la migration. Les 5µL présents dans les tubes, ont été déposés dans les puits du gel.

Un puits sur chaque ligne du gel, a été rempli avec 5µL d'un étalon de poids moléculaire de 1kilobase donnant une bande tous les 100 paires de bases et qui permet de comparer la taille des fragments. La migration dure 40 à 50 minutes à 80 volts. Grâce au champ électrique, l'ADN chargé négativement, va migrer vers la cathode chargée positivement.

- ***Révélation***

Enfin, le gel a été placé sous ultraviolets pour révélation. A l'aide d'un appareil photo une photo des résultats a été prise et enregistrée.

2.3.4 Purification des produits de la PCR nichée

La première purification des produits de la PCR nichée a pour but d'isoler les amplicons d'ADN et d'éliminer les restes de réactifs (enzymes, amorces, nucléotides, sels...). Cette technique de purification se réalise en microplaque, constituée de puits plats au fond desquels se trouve une membrane qui sert de filtre.

Pour cette technique de purification par microfiltration, des plaques de purification *NucleoFast*® 96PCR ont été utilisées sur une pompe machery Nagel. Cinquante microlitres (50 µl) de produits de la PCR nichée ont été chargés sur le filtre. Un vide est appliqué, le liquide est aspiré tandis que les amplicons d'ADN sont retenus à la surface du filtre. Pour que la technique fonctionne, il est nécessaire que les fragments d'ADN aient une taille supérieure à 150 paires de base. Sinon, ils risqueraient d'être aspirés également à travers le filtre. Ensuite, une étape de lavages à l'eau PPI a été réalisée avant de récupérer sur une autre microplaque, les fragments d'ADN élués dans 100 µl, qui se trouvent au-dessus du filtre.

2.3.5 Séquençage

2.3.5.1 Principe

Le séquençage est une méthode qui consiste à déterminer la succession des nucléotides sur l'ADN. Ce procédé, permet de déterminer les différentes anomalies responsables de maladies génétiques, ou mutations à l'origine de la résistance aux traitements antirétroviraux. La méthode utilisée dans notre laboratoire est celle de Sanger automatisée.

Cette méthode est basée sur une technique de PCR classique appelée réaction de séquence, réalisée sur les produits purifiés précédemment. Cependant, une seule amorce sens ou anti-sens est utilisée pour ne séquencer qu'un seul brin d'ADN.

Dans le mélange réactionnel, des Didésoxyribonucléotides Triphosphates (ddNTP) sont ajoutés. Par rapport aux Désoxyribonucléotides (dNTP), le groupement 3'OH du ribose est absent. Ils ont en plus, la particularité d'être marqués par un fluorochrome spécifique de chaque nucléotide.

Après hybridation de l'amorce avec sa séquence complémentaire à analyser, l'enzyme Taq polymérase assure l'élongation de l'amorce par l'incorporation de dNTP. Cependant, lorsque l'enzyme rencontre et incorpore un ddNTP à la place d'un dNTP, elle ne peut plus continuer sa polymérisation. En effet, l'absence du groupement 3'OH sur le ddNTP empêche sa liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. La réaction d'extension est alors interrompue.

Théoriquement, un ddNTP est incorporé pour chaque position. Ainsi, de nombreux fragments d'ADN sont obtenus, de tailles variables avec une base marquée à leur extrémité(78).

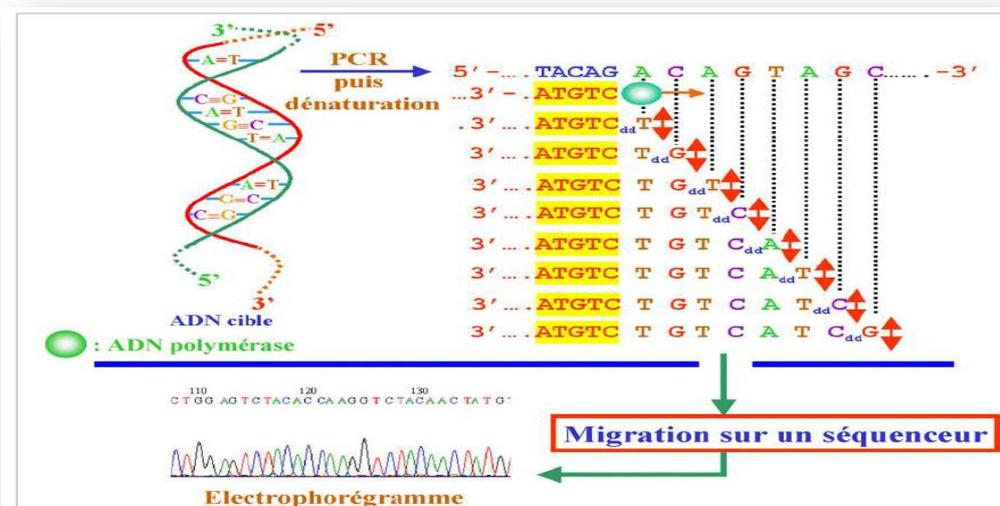


Figure 17: principe du séquençage selon la méthode de Sanger(78)

2.3.5.2 Technique utilisée

La réaction de séquence a été réalisée avec le kit *Big dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Ce kit est un mélange réactionnel contenant :

- L'enzyme *Taq polymerase*
- Les 4 désoxyribonucléotides
- Les 4 didésoxyribonucléotides marqués chacun par un fluorochrome différent

2.3.5.2.1 Amorces

Les couples d'amorces utilisés pour la réaction de séquence sont identiques à ceux utilisés précédemment pour la PCR nichée avec des concentrations différentes.

2.3.5.2.2 Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel a été préparé de la même manière que ceux des PCR précédentes. La composition est indiquée dans le tableau XI.

Ensuite, sur une microplaque, 18µl du mélange réactionnel sont distribués dans les puits, auxquels sont ajouté 2 µl d'ADN purifié.

Tableau XI : composition du mix pour la réaction de séquence.

Réactifs	Concentration	Volume par puits
Amorce	3.2 µM	1µl
Eau PPI	NA	12 µl
Tampon Big Dye	–	3 µl
<i>Big Dye terminator v 3.1</i>	–	2 µl

2.3.5.2.3 Paramétrage du thermocycleur

La réaction de séquence a été effectuée dans un thermocycleur programmé manuellement dont le programme et profils de température sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: programme et profils de température utilisés pour la réaction de séquence.

Température	Temps	nombres de cycles	Etape
96°C	30 s	25	Dénaturation
50°C	30 s		Hybridation
60°C	4 min		Elongation
4°C	infini		Refroidissement

2.3.6 Purification des produits de la réaction de séquence

Pour conserver uniquement les brins d'ADN « propres » et éliminer les ddNTP qui peuvent gêner la lecture au séquenceur, une purification des produits de la PCR de séquence a été réalisée par la méthode de purification à l'acétate de sodium.

Les produits ont été transférés dans des microtubes de 0.5 ml. Dans chaque microtube, 80 µl d'un mélange dont la composition se trouve dans le tableau XIII ont été ajoutés, puis chaque tube a été vigoureusement mélangés (vortexé) pendant 10s. Les tubes ont été incubés pendant 15 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 14 000 rpm et à 4°C pendant 20 à 25 minutes. Après retrait des tubes de la centrifugeuse les surnageant ont été retirés à l'aide d'une micropipette. Ensuite 100 µl d'éthanol 70% ont été ajoutés aux tubes, puis après agitation par retournement une deuxième centrifugation a été réalisée à 14000 rpm et à 4 °C pendant 10 à 15 minutes. Après retrait de la centrifugeuse les surnagent ont été de nouveau éliminé et les tubes sont restés séchés à température ambiante pendant au moins 3h. L'ADN du culot a été remis en suspension dans 20 µl de formamide puis transféré sur une plaque.

Tableau XIII: composition du mélange réactionnel pour la purification des produits de réaction de séquence

Réactifs	Concentration	Volume pour un réactif (µl)
Acétate de sodium pH 4.7	3M	3
Ethanol absolu	–	62.5
Eau PPI	NA	14.5

2.3.7 Migration électrophorétique

La dernière étape du séquençage, consiste en une électrophorèse sur capillaire dans le séquenceur automatisé *ABI 3500/3500XL* pour séparer les fragments d'ADN qui vont migrer selon leur taille.

Un gel de polyacrylamide hautement résolutif (qui sépare l'ADN base par base), est injecté dans un capillaire. Ce capillaire est immergé dans la solution d'ADN précédemment purifiée. Le liquide monte dans le capillaire et se diffuse sous l'influence d'un champ électrique. Au bout du capillaire, un laser excite les fluorochromes présents sur chaque ddNTP. A chaque passage d'un fragment d'ADN, la fluorescence émise est mesurée. Le signal lumineux est traité par un ordinateur qui donne les résultats sous forme d'un fluorogramme par une succession de pics de couleurs différentes, chaque couleur correspondant à un nucléotide donné. Cela permet d'assigner une base et de déterminer la séquence nucléotidique(78).

2.3.8 Analyse des séquences (chromatogramme)

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été récupérées et transférées dans le SeqManTM5.08 +

Il s'agit d'un logiciel qui permet d'aligner les séquences déterminées avec des séquences de référence contenant les mutations. Les séquences nucléotidiques sont traduites en séquences protéiques d'acides aminés(78).

2.3.8.1 Détermination du profil de résistance

La recherche des mutations de résistance a été faite à partir de la base de données HIV Drug Résistance de Stanford University (disponible sur <http://hivdb.stanford.edu/>).

2.4 Collecte des données

Les données suivantes ont été collectées à partir du registre du laboratoire de biologie moléculaire VIH :

- Données sociodémographique (âge, sexe)
- Données cliniques (signes cliniques, prophylaxie reçu à la naissance)
- Données concernant l'allaitement (type et durée)

2.5 Traitement et analyse des données

Les données ont été saisies sur Excel 2016 et traité sur IBM SPSS V 2.0.

2.5.1.1 Considération éthique

Le protocole a été soumis à l'approbation du comité d'éthique de l'INRSP avant sa mise en œuvre.

3. Résultats

3.1 Caractéristiques sociodémographiques des patients

Les tableaux et figures suivants résument les caractéristiques sociodémographiques de nos patients

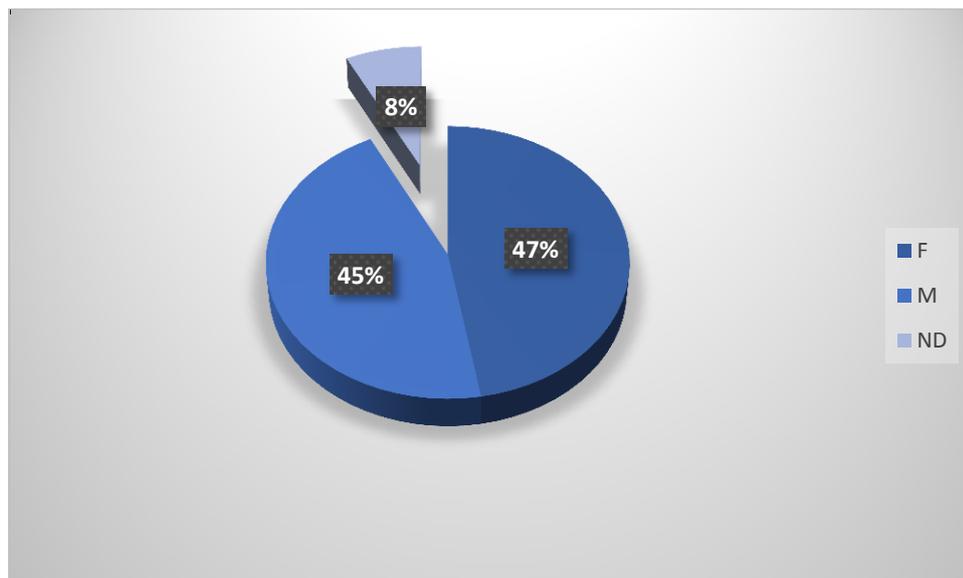


Figure 16 : répartition des patients en fonction du sexe

*ND : données non disponibles

Le sexe féminin était le plus représenté avec 47%.

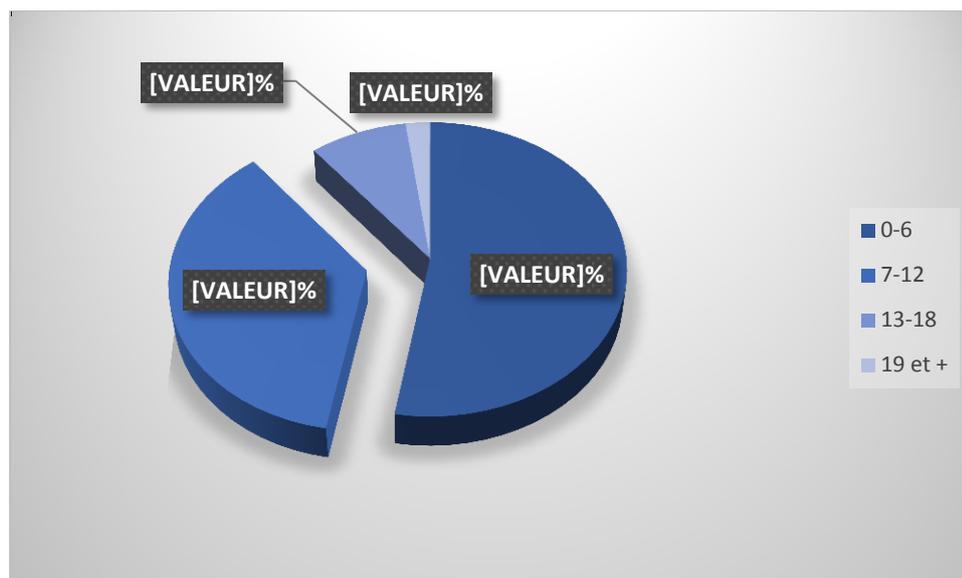


Figure 18 : répartition des patients en fonction de la tranche d'âge.

Parmi nos patients, ceux âgés de 0-6 mois étaient les plus nombreux avec 45.4%.

Tableau XIV :répartition des patients en fonction de la provenance

Régions	Sites	Effectifs	Pourcentage
Bamako	CESAC	5	4,6
	CI	7	6,5
	CII	4	3,7
	CIV	3	2,8
	CV	8	7,4
	CVI	5	4,6
	CNAM	2	1,9
	HGT	38	35,2
	Luxembourg	5	4,6
Kayes	CERKES	3	2,8
Koulikoro	USAC Koulikoro	4	3,7
	USAC Kati	5	4,6
Sikasso	CSref Bougouni	2	1,9
	USAC Koutiala	3	2,8
Ségou	CSref Bla	1	0,9
	CTA walé	5	4,6

Nos patients provenaient du district de Bamako et des quatre premières régions du Mali. Cependant, la majorité, provenait de Bamako plus précisément du CHU Gabriel Touré.

3.2 Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des patients

Les tableaux et figures de ce sous chapitre, nous montrent les données cliniques et thérapeutiques des patients.

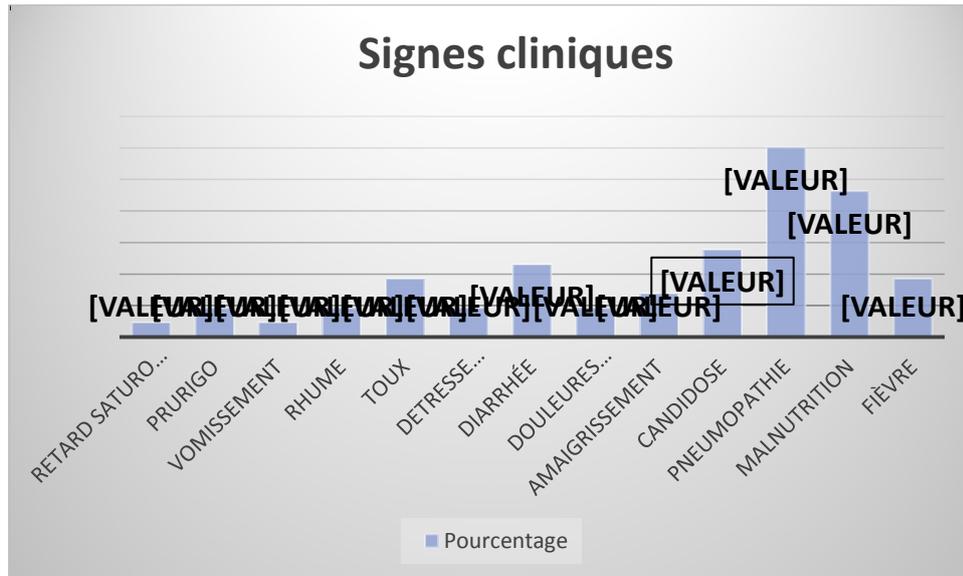


Figure 19 : répartition des patients en fonction des signes cliniques

Parmi les signes cliniques retrouvés, les pneumopathies ressortent le plus fréquemment avec 12% des cas.

TABLEAU XV : REPARTITION DES PATIENTS EN FONCTION DU TYPE D'ALLAITEMENT

Type d'allaitement	Effectifs	Pourcentage
Artificiel	10	9,3
Maternel	70	64,8
Mixte	15	13,9

La plupart de nos patients, soit 64.8 % d'entre eux étaient nourris par le lait maternel.

Tableau XVI : répartition des patients en fonction de la prophylaxie ARV reçue à la naissance

Prophylaxie ARV	Effectif	Pourcentage
Non	67	62,0
Oui	14	13,0

Environ 62% de nos patients n'ont pas reçue de prophylaxie ARV à la naissance.

3.3 Résultats de la PCR

La figure suivante, montre les résultats de l'amplification par PCR de nos gènes ciblés.

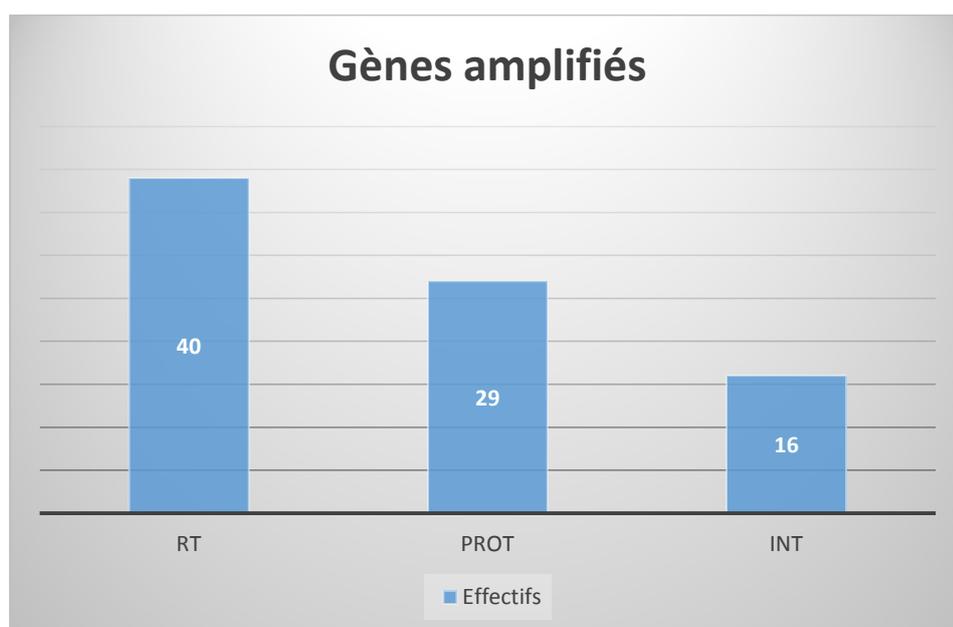


Figure 20 :résultats de l'amplification des gènes

Sur nos 108 échantillon testés par PCR nous avons pu amplifier 40 gènes de reverse transcriptase, 29 gènes de protéase et 16 gènes d'intégrase.

3.4 Résultats du séquençage

Ce sous chapitre résume les résultats de nos gènes séquencés.

Le tableau ci-dessous résume les proportions de gènes séquencés sur les gènes amplifiés.

Tableau XV : proportions de gènes séquencés par rapport aux gènes amplifiés

	Gènes amplifiés	Gènes séquencés	Pourcentage de gènes séquencés
RT	40	16	40
Prot	29	29	100
INT	16	12	75

Sur les gènes amplifiés pour RT, Prot et INT respectivement 40%, 100% et 75% ont pu être séquencés.

La figure suivante montre la répartition des patients en fonction des sous-types du vih-1

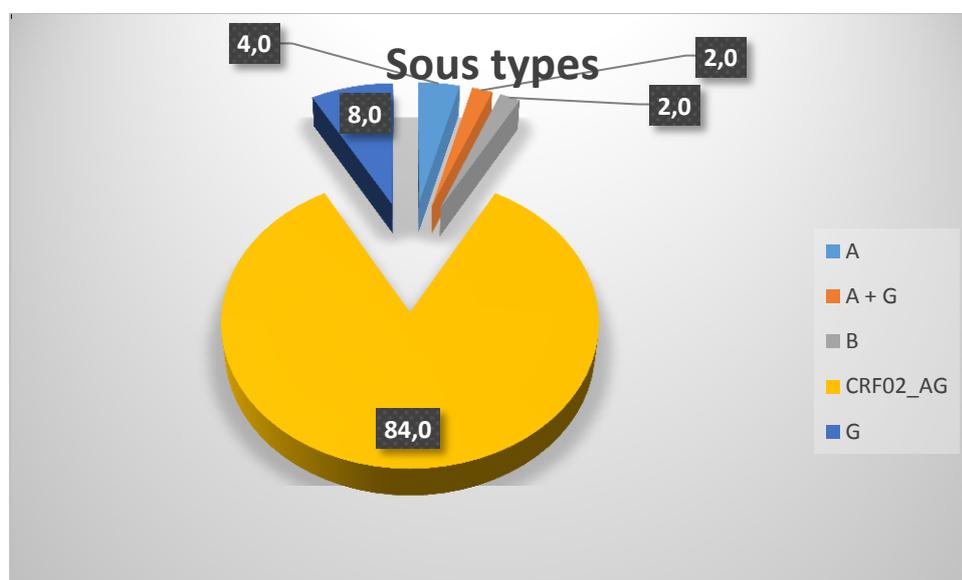


Figure 21 :répartition des patients en fonction des sous-types du vih-1

Le sous type CRF02_AG était le plus représenté avec 84% des cas.

La figure suivante montre les proportions de mutations de résistance associées aux INTI.

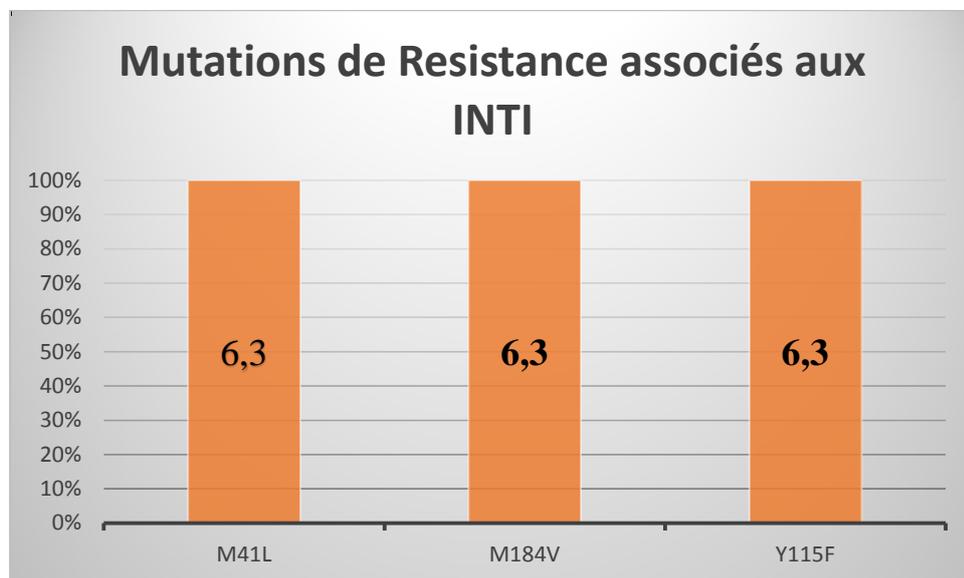


Figure 22 : fréquence des mutations associées aux INTI

Nous avons retrouvé la même fréquence (6,3 %, 1/16) pour trois mutations à savoir, la M41L, la M184V et la Y115F pouvant conférer une résistance à la ZDV, d4T, 3TC, FTC, ABC, TDF.

La figure ci-contre résume la fréquence des mutations de résistance associées aux INNTI.

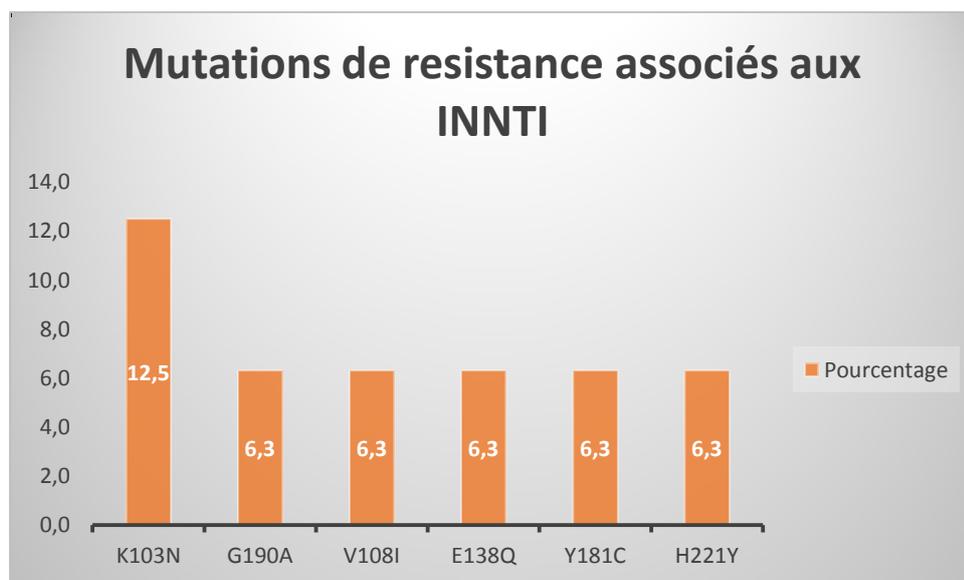


Figure 23 : fréquence des mutations de résistance associées aux INNTI

La mutation K103N conférant une résistance à la NVP et l'EFV était la plus retrouvée avec une fréquence de 12,5% (2/16). Elle est suivie des mutations G190A, V108I, E138Q, Y181C et H221Y avec la même fréquence (6,3% ; 1/16).

La figure ci-dessus résume les mutations majeures de résistance associées aux IP

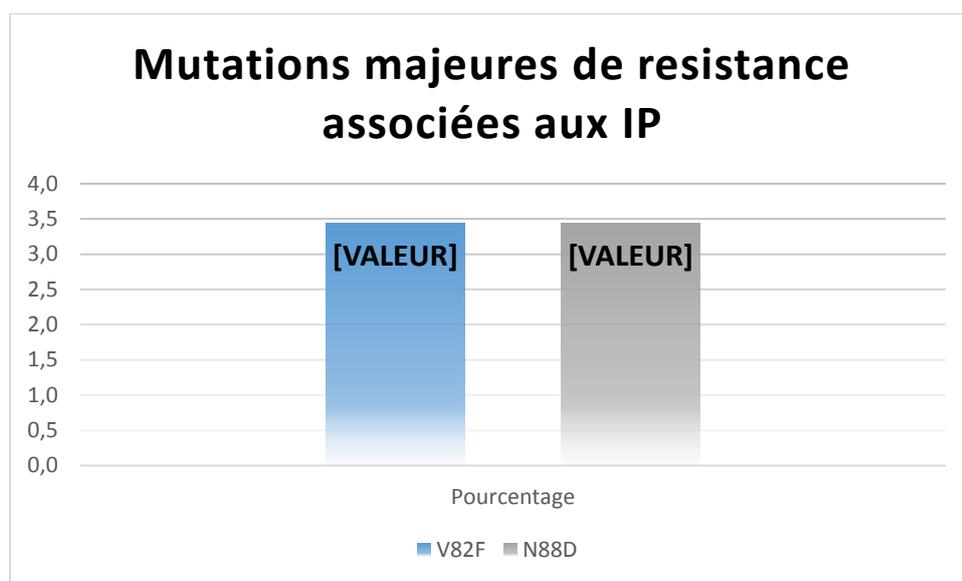


Figure 24 : fréquence des mutations majeures de résistance associées aux IP

Seulement deux mutations majeures de résistance associées aux IP ont été retrouvées avec une fréquence de 3,3 % (1/29).

La figure qui suit montre les mutations mineures de résistance associées aux IP.

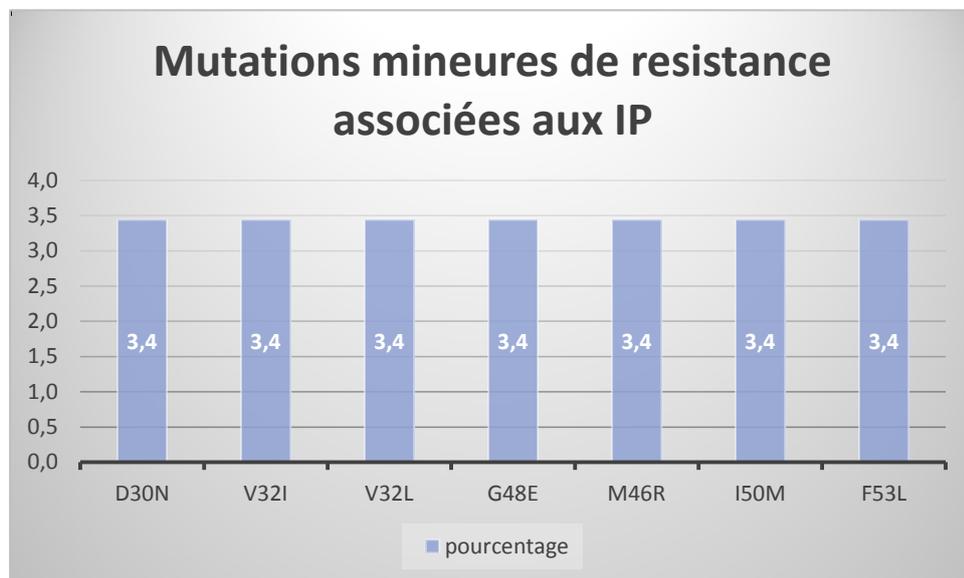


Figure 25 : fréquence des mutations mineures de résistance associées aux IP

Des mutations mineures de résistance associées aux IP (D30N, V32IL, G48E, M46R, I50M, F53L) ont été retrouvées avec la même fréquence à savoir 3,3 % (1/29).

La figure suivante nous montre la fréquence des mutations mineures de résistance associées aux inhibiteurs de l'intégrase.

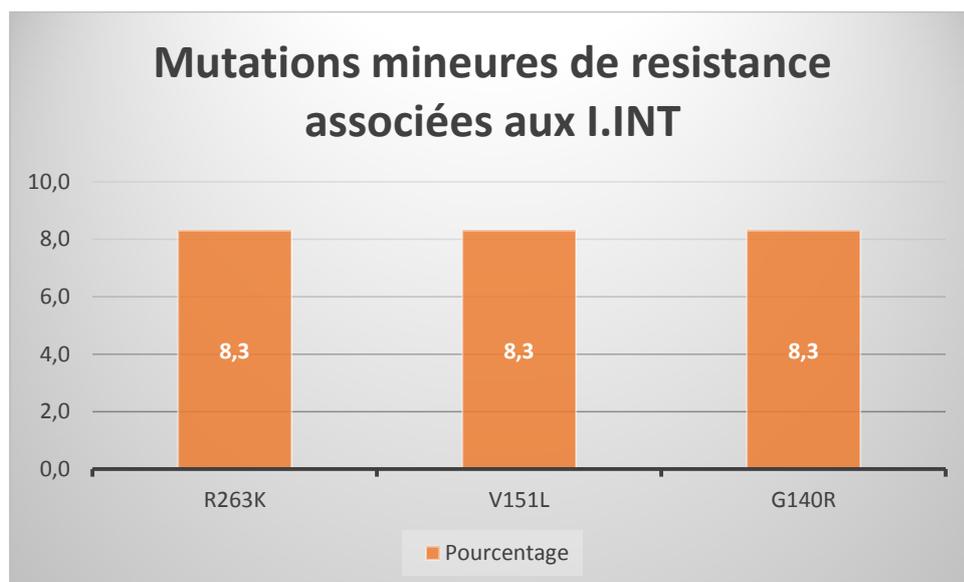


Figure 26 : fréquence des mutations mineures de résistance associées aux I.INT

Trois mutations mineures de résistance associées aux I.INT ont été retrouvées à savoir la R236K ; la V151L ; et la G140R avec une fréquence de 8,3% (1/12).

4. Commentaires et discussion

En dépit des efforts considérables fournis dans la lutte contre l'infection à VIH, cette infection reste encore une des causes majeures de morbidité et de mortalité des patients et particulièrement les enfants en Afrique. L'avènement des trithérapies ARV a considérablement transformé le cours de l'infection depuis plus de 3 décennies, cette infection jadis fatale, est devenue une infection chronique bien contrôlable. Cependant, la résistance aux ARV est une menace pour ce contrôle de l'infection notamment chez les enfants qui doivent prendre les molécules ARV pendant toute leur vie.

Dans le cadre de la surveillance de la résistance aux ARV chez les patients infectés par le VIH-1 initiant un traitement antirétroviral que suggère l'OMS, nous avons étudié la résistance aux différentes classes thérapeutiques disponibles au Mali chez les nouveau-nés de mères infectées par le VIH-1 ayant bénéficié d'un diagnostic précoce entre 2012 et 2013. Il s'agissait d'une étude transversale qui a inclus 108 nouveau-nés dépistés positifs pour l'infection à VIH-1 par la technique PCR sur des prélèvements de type DBS. Nous avons réalisé le génotypage de résistance dans les régions RT, Prot et INT du gène *Pol* selon le protocole de l'Agence Nationale de recherche sur le Sida et les hépatites en France (ANRS).

- ***Caractéristiques des patients***

Sur les données disponibles, nous avons observé que 47 % de notre population était de sexe féminin contre 45% de sexe masculin. Parmi nos patients, 84,3 % (91/108) étaient âgés de 0 à 18 mois. Cette population est comparable à celle de *M. Salou* qui a étudié la résistance aux ARV sur une cohorte d'enfants tous âgés de 0 à 18 mois, en 2013 au Togo (14).

Nos patients provenaient pour la plupart du CHU Gabriel Touré, cela peut s'expliquer par le fait que ce CHU abrite un centre d'excellence de prise en charge pédiatrique du VIH/SIDA au sein de son unité de pédiatrie.

L'allaitement maternel était le mode d'alimentation le plus utilisé pour nos patients, cela peut s'expliquer d'une part par le protocole national de prise en charge qui recommande un allaitement maternel exclusif jusqu'à six mois avec un sevrage à 12 mois. Et d'autre part, par la culture au Mali de nourrir son enfant au sein jusqu'à 2 ans environ. En effet, les femmes séropositives peuvent se sentir discriminer dans la famille en adoptant un allaitement artificiel. Aussi, le coût lié à un allaitement artificiel peut ne pas être à la bourse des familles.

La majorité des patients soit 62% n'ont pas reçu de prophylaxie ARV à la naissance pour les protéger de la transmission du virus. Ce qui peut s'expliquer par un retard de diagnostic des mères pendant la grossesse et du non-respect des protocoles de la PTME dans certaines structures. Ce manque de prophylaxie à la naissance est un facteur de transmission mères-enfants du VIH.

- ***Amplification par PCR/séquençage***

Nous avons réalisé le séquençage sur le gène de la *pol*(RT, protéase et intégrase) pour 108 échantillons. Le taux d'amplification globale pour les trois gènes de la *pol* était de 38,9% (42/108). Les gènes de la RT, de la protéase et de l'intégrase ont été séquencés avec succès chez 40% (16/40), 100% (29/29) et 75% (12/16) respectivement. Le faible taux d'amplification pour la RT par rapport à la protéase et à l'intégrase pourrait être dû aux différences de taille entre les 3 gènes. En effet, les gènes de petites tailles sont plus faciles à amplifier que ceux de tailles longues avec la technique maison ANRS que nous avons utilisé.

Par ailleurs, ce faible taux d'amplification pourrait s'expliquer également par des difficultés liées entre autres à la nature des prélèvements DBS. En effet, l'extraction sur un échantillon de type plasma est plus sensible que ce sur le DBS. De plus, l'extraction de l'ADN a été effectuée par une méthode manuelle, ce qui pourrait diminuer aussi la sensibilité par rapport à une extraction automatisée. Les conditions de conservation de nos échantillons peuvent aussi impacter sur la qualité de l'amplification des produits.

D'autres études ont également évoqué des difficultés d'amplification des gènes d'intérêt comme celle de Derache et al sur 198 échantillons. Les auteurs n'ont pas réussi à amplifier 5 gènes de protéase et 12 gènes de reverse transcriptase lors d'une étude réalisée en 2005 à Bamako et à Ségou sur l'évolution de la diversité génétique et la résistance du VIH-1 aux ARV (42). Ces difficultés ont également été rapportée par une étude de mise au point de la technique de génotypage sur l'ADN proviral réalisée en 2016 au laboratoire de virologie du CHU d'ANGERS, sur 71 gènes amplifiés par PCR le séquençage a échoué pour six gènes (2 gènes de Protéases, 3 gènes de reverse transcriptases ,1 gène d'intégrase et 1gène de gp120)(79). Des difficultés internes au laboratoire à savoir les ruptures des réactifs et les pannes d'automates, expliquent aussi le fait que nous n'avons pas pu séquencés la totalité des gènes amplifiés.

- ***Profils de mutations de résistance identifiées dans l'étude***

Nos résultats montrent un taux global de 16,66% (7/42) de mutations de résistance primaire associées aux ARV. Ce taux est inférieur à la prévalence retrouvée par *M. Salou et al* au Togo en 2013, où il trouvait au moins une mutation de résistance dans 60% des génotypes (121/201)(14). Le taux obtenu dans notre étude peut s'expliquer d'une part par le petit nombre de séquences analysées et d'autre par une moindre sensibilité de la nature du prélèvement, le sang total sur DBS entraînant un faible taux d'amplification. En effet, on pourrait détecter plus de mutations sur du plasma à partir d'une extraction ARN qu'une extraction ADN sur du sang total(80). Cependant, Fofana et al ont retrouvé un taux élevé de mutations de résistance chez des enfants en échec virologique au Benin à partir de prélèvements plasma mais prélevés sur papier buvard comme type DBS (81).

Par ailleurs, les résultats montrent un taux de mutations de résistance associées aux différentes classes ARV de 12,5% (2/16) pour les INTI, 18,75 % (3/16) pour les INNTI, 6,89% (2/29) pour les IP et aucune mutation de résistance majeure associée aux INI chez nos patients, mais une mutation polymorphique situé à une position de résistance a été retrouvée. Ce taux est relativement faible surtout pour les INNTI comparé aux études réalisées dans la population pédiatrique en Afrique. *Crowell et al*, ont trouvé en 2013 un taux de résistance de 23% pour les INNTI à baseline dans une étude chez les enfants âgés de moins de 5 ans au Mali (82). Fofana et al ont trouvé également 84% de mutations de résistance associées aux INNTI chez des enfants en échec virologique(81).

Par ailleurs nous avons noté chez un de nos patients, la présence de mutations de résistance associées aux deux classes avec un virus qui présentait à la fois des mutations de résistance M41L, M184V pour les INTI et les mutations K103N, V108I et E138Q pour les INNTI.

- ***Profils des mutations de résistance associées aux INTI***

Nous avons retrouvé trois mutations avec une fréquence de 6,3 % chacune : M41L, M184V, Y115F. La mutation M184V est associée à une résistance de haut niveau à la 3TC et FTC et une faible résistance à la ddI et l'ABC. Cette mutation est la plus fréquemment retrouvée dans les études de résistance chez les adultes en Afrique subsaharienne(83). Elle est également

retrouvée dans les études de résistance chez les enfants (14). Fofana et al, ont retrouvé 47% de cette mutation dans une population pédiatrique au Benin (81). Cependant, malgré la présence de la mutation M184V, la poursuite du traitement par la 3TC ou le FTC peut être envisagée car cette mutation semble avoir un moindre fitness lors de la réplication virale.

La M41L est un TAM (thymidine associated mutations) qui s'accompagnent généralement de la mutation T215Y. En combinaison avec T215Y, la M41L confère une résistance intermédiaire ou de haut niveau en association avec d'autres mutations à l'AZT et au d4T et pourrait réduire la sensibilité du ddI, ABC et TDF. La mutation Y115F est une mutation moins fréquente associée une résistance de faible niveau à l'ABC et au TDF. Ces mutations avec d'autres TAM sont très fréquemment retrouvées dans les études de résistance acquise (81, 83).

▪ *Profils des mutations de résistance associées aux INNTI*

Six mutations de résistance associées aux INNTI ont été retrouvées : K103N, G190A, V108I et E138Q, Y181C, H221Y dont la plus fréquent était la K103N à 12,5%.

Cette mutation K103N est associée à une résistance de haut niveau aux INNTI de la première génération (la NVP et l'EFV). Cependant, elle n'impacte pas les autres molécules de cette classe à savoir la RPV, l'ETR et la DOR.

D'autres mutations de résistance associées comme la V108I, E138Q/G, Y181C, H221Y et la G190A ont été également retrouvées. La mutation V108I est une mutation sélectionnée chez les patients recevant la NVP, EFV et l'ETR. Elle provoque une faible résistance à la NVP et potentiellement une faible résistance à l'EFV. Elle ne semble pas réduire la susceptibilité à l'ETR ou la RPV. Les mutations E138Q/G sont des mutations qui peuvent être sélectionnées sous pression thérapeutique des INNTI de deuxième génération (ETR et RPV). La mutation Y181C peut être sélectionnée sous la pression de l'ensemble des INNTI. Elle est responsable ainsi de la résistance croisée dans cette classe. Sa présence entraîne une réduction importante de la sensibilité à la NVP, une réduction moyenne de la sensibilité au RPV et à l'ETR, ainsi qu'une réduction faible de la sensibilité de l'EFV et de la DOR. Elle a été retrouvée dans les études de résistance acquise et très rarement dans les études de résistance primaire ou transmise en Afrique (14, 83). La mutation H221Y est une mutation qui impacte

principalement la sensibilité de la NVP et de la RPV. Elle apparaît fréquemment en association avec la mutation Y181C. La G190A est également une mutation qui peut provoquer une résistance de haut niveau à la NVP et une résistance intermédiaire à l'EFV.

▪ **Profils des mutations de résistance aux IP**

L'analyse de nos séquences de protéases a révélé neuf mutations, dont deux majeures (N88D, V82F) et sept mineures (V32L, G48E, D30N, M46R, I50M, F53L, V32I). Rappelons que les mutations majeures sont des mutations dont l'unique présence induit un niveau de résistance élevé à un médicament donné et les mutations mineures sont des mutations pour lesquelles l'accumulation de plusieurs substitutions secondaires est nécessaire pour observer un phénotype de résistance élevé.

La mutation N88D est une mutation sélectionnée par la NFV, généralement associée à D30N, il semble être associé à une résistance croisée de faible au VTT et au SQV.

La V82F est une mutation aussi sélectionnée principalement par l>IDV et le LPV. Il réduit la sensibilité du virus à ces IP et peut contribuer en association avec d'autres mutations à la résistance croisée aux IP.

Toutes ces mutations ont été retrouvées avec la même fréquence mais faible, soit 3,53%. *Crowell et al* n'ont retrouvé aucune mutation de résistance associées aux IP (82). Cependant, Fofana et al dans leur étude ont retrouvé 4% chez des enfants au Bénin (81).

• **Profils des mutations de résistance aux I.INT**

Aucune mutation majeure associée à la résistance aux INI n'a été retrouvée parmi les séquences analysées. Fofana n'avait également pas retrouvé de mutations majeures associées aux I. INT dans sa population pédiatrique au Bénin(81).

Nous avons cependant observé chez nos patients, trois mutations conférant une résistance de moindre niveau aux I.INT. Il s'agit des mutations V151L, R236K, G140R, avec une fréquence de 8,3 % chacune.

La mutation V151L est une mutation extrêmement rare sélectionnée in vitro par les premiers INI expérimentaux, elle réduit la sensibilité au RAL et le DTG. Cependant aucune sélection in vivo n'a été rapportée avec cette mutation

La G140R est une mutation polymorphique retrouvée à une position majeure de résistance.

- ***Diversité génétique et sous-types identifiés***

Notre étude a montré une prédominance du recombinant CRF02_AG. La plupart des études réalisées en Afrique de l'ouest ont montrées que le CRF02_AG est le sous type prédominant dans cette partie de l'Afrique (81)(84, 85). Au Mali une étude menée par Derache et al en 2005 a montré une prédominance du CRF02_AG dans 75% des cas. Une autre étude réalisée au Burkina Faso par *Sylla et al* a montré la prédominance de cette forme recombinante avec un pourcentage de 56,5% (86).

- ***Les limites de notre étude***

Notre étude consistait à évaluer la résistance primaire en milieu pédiatrique. Elle a été limitée d'une part par un manque d'information sur le suivi virologique et immunologique des mères et des nouveau-nés au moment de la collecte des échantillons, et d'autre part par une insuffisance de données concernant l'exposition aux ARV des mères et des enfants. Nous n'avions pas de données sur les molécules reçues, la période et la durée d'exposition. Nous n'avons donc pas pu réaliser des analyses de résistance stratifiées entre les enfants exposés à une prophylaxie et les enfants non exposés.

Du point de vue technique nous avons réalisé nos tests de génotypages sur l'ADN proviral à partir des échantillons de DBS. Selon la littérature les tests de résistance à partir de l'ADN proviral sont moins sensibles. Moins de mutations sont détectées à partir de l'ADN par rapport à l'ARN plasmatique (80).

Nous avons utilisé la méthode de Sanger comme technique de séquençage direct. Bien qu'il s'agisse de la méthode standard génotypique, elle ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant moins de 20% de la population virale totale.

Cependant, malgré ces limites, notre étude a permis de mettre en évidence des données sur la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les nouveau-nés de mères séropositives pour le VIH au Mali.

5. Conclusion

Nous avons réalisé une étude transversale et descriptive sur les prélèvements DBS provenant de 108 enfants. Nous avons observé au moins une mutation de résistance associée aux ARV chez 16,66 % de nos patients. Les prévalences de mutations de résistance associées aux INTI, INNTI, IP étaient respectivement 12,5 %, 18,75% et 6,89%. Aucune mutation majeure associée aux I. INT. Le sous type CRF02_AG a été le sous type le plus prévalent avec 84%. Les INNTI restent la classe la plus touchée avec un taux de 18,75%. Cette classe étant encore largement utilisée dans notre pays ainsi que dans la plupart des pays à ressources limitées, il est impératif de surveiller régulièrement la résistance primaire en milieu pédiatrique afin de disposer des informations indispensables à l'amélioration de leur prise en charge. Aussi, la faible résistance aux IP et l'absence de la résistance aux I.INT supportent l'utilisation de ces molécules chez les enfants surtout en initiation. L'émergence de la résistance chez les nouveau-nés est inquiétante surtout dans un contexte où le suivi biologique par la charge virale et les options thérapeutiques sont limités.

6. Recommandations

Au terme de cette étude et à la lumière des résultats obtenus, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et programmes (HCNLS, CSLS) :

Renforcer la surveillance de la résistance aux antirétroviraux, chez les PVVIH en général et les enfants en particulier.

Améliorer le système d’approvisionnement, afin d’éviter les ruptures de réactifs.

Rendre les moyens disponibles pour la réalisation des tests de géotypages.

Sensibiliser les femmes enceintes vivant avec le VIH sur l’importance de la PTME, afin d’éviter la transmission des virus résistants aux nouveau-nés.

A l’INRSP

Assurer une maintenance régulière du plateau technique par des ingénieurs qualifiés.

Renforcer la chaîne de froid, pour mieux conserver les échantillons destinés à être utilisés pour des études ultérieures.

Impliquer plusieurs personnes dans la réalisation des tests de résistance

Aux partenaires techniques et financiers

Appuyer la surveillance de la résistance aux ARV par :

Le renforcement des capacités et des ressources humaines qualifiées pour la réalisation des tests de géotypage.

La disponibilité des réactifs et intrants liés à la réalisation des tests de géotypage.

Aux cliniciens

Un meilleur suivi des femmes enceintes, en s’assurant de l’application de la PTME.

La prescription d’un test de dépistage précoce dès les premiers mois de vie de l’enfant, de préférence avant 18 mois.

En cas de positivité du test de dépistage, la réalisation d'un test de génotypage avant tout traitement ARV.

 Aux femmes enceintes vivant avec le VIH

Une meilleure observance au traitement au cours de la grossesse, afin d'éviter la sélection des variants résistants et leur transmission au fœtus.

Un respect strict des programmes de la PTME.

S'informer aux près des professionnels de santé, sur les attitudes à adopter pour préserver leursanté et celle de leurs nouveau-nés.

7. Références

1. OMS. Dix faits sur le VIH. 2017.
2. ONUSIDA. Fiche d'information juillet 2018. 2018.
3. ONUSIDA. données mondiales sur le VIH/SIDA, données régionales 2015, thérapie antirétrovirale par région 2015. FICHE D'INFORMATION: ONUSIDA; 2016 [cited 2016 27/12/2016]; fiche d'information]. Available from: <content://com.sec.andriod.app.sbrowser/1227114809.mhtml>.
4. ONUSIDA. Estimation VIH/SIDA 2015 (Mali). ONUSIDA2015 [cited 2017 20/03/2017]; Fiche d'information]. Available from: <content://com.sec.andriod.app.sbrowser/0304200243.mhtml>.
5. El-Sadr W, Neaton J. Strategies for management of antiretroviral therapy study. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment N Engl J Med. 2006;355:2283-96.
6. Issa I. Etude de l'observance du traitement ARV des patients suivis à l'hôpital de Gao: Thèse Med. 2008. Bamako, Mali; 2008.
7. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerging infectious diseases. 2002;8(9):891-6.
8. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. New England Journal of Medicine. 1981;305(24):1425-31.
9. Grmek MD. Histoire du sida. Paris: Payot. 1989:M6decine.
10. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M-A, Santos-Ferreira M, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 1986;233(4761):343-6.
11. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. Nature. 2008;455(7213):661.
12. Stulac S, Franke M, Rugira I, Uwamuhoro L, Bucyibaruta B, editors. Successful implementation of replacement feeding for HIV exposed infants.[Oral]. HIV/AIDS Implementers' meeting Kigali, Rwanda; 2007.
13. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2011;1(1):a006841.

14. Diop ca. accessibilité au diagnostic précoce de l'infection à VIH et caractérisation moléculaire de la résistance aux ARV en milieu pédiatrique au Togo: Université de Lomé (Togo; 2016).
15. Peeters M, Jung M, Ayouba A. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert review of anti-infective therapy*. 2013;11(9):885-96.
16. Brun-Vezinet F, Wainberg M. HIV: structure, multiplication et physiopathologie. *Traité de Virologie Médicale* Estem ed Paris Edition Estem. 2003:319-29.
17. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(45):19114-9.
18. Mouscadet J-F, Tchertanov L, Deprez E. Structures et rôles de l'intégrase du VIH dans le cycle viral. *Virologie*. 2007;11(3):143-52.
19. Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, Bonifacino JS. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *Journal of virology*. 2007;81(8):3877-90.
20. Lubben NB, Sahlender DA, Motley AM, Lehner PJ, Benaroch P, Robinson MS. HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(9):3351-65.
21. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(3):236.
22. Lévy-Chavagnat D. Focus sur cinq antirétroviraux récents. *Actualités pharmaceutiques*. 2009;48(485):10-1.
23. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology*. 1999;17(1):657-700.
24. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*. 2014;384(9939):258-71.
25. Commenges D, Alioum A, Lepage P, Van de Perre P, Msellati P, Dabis F. Estimating the incubation period of paediatric AIDS in Rwanda. *AIDS (London, England)*. 1992;6(12):1515-20.
26. Blanche S. L'infection à VIH de l'enfant. *Revue Française des Laboratoires*. 1997;1997(290):55-8.

27. Courpotin C. Histoire naturelle de l'infection à VIH chez l'enfant. DU Paris 7/ IMEA. 2010.
28. Vreeman RC, Wiehe SE, Pearce EC, Nyandiko WM. A systematic review of pediatric adherence to antiretroviral therapy in low-and middle-income countries. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(8):686-91.
29. Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(19):1337-42.
30. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *Journal of Infection*. 2013;66(5):391-400.
31. Lihana RW, Ssemwanga D, Abimiku AI, Ndembu N. Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. *AIDS Rev*. 2012;14(2):83-100.
32. Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *Aids*. 2003;17(18):2547-60.
33. De Leys R, Vanderborght B, Haesevelde MV, Heyndrickx L, Van Geel A, Wauters C, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of virology*. 1990;64(3):1207-16.
34. Aghokeng AF, Kouanfack C, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E. Successful integrase inhibitor-based highly active antiretroviral therapy for a multidrug-class-resistant HIV type 1 group O-infected patient in Cameroon. *AIDS research and human retroviruses*. 2013;29(1):1-3.
35. Ayouba A, Souquière S, Njinku B, Martin PM, Müller-Trutwin MC, Roques P, et al. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids*. 2000;14(16):2623-5.
36. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871.
37. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(15):1590-602.
38. Foley B, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J. HIV Sequence Compendium 2013. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR-13-26007, 2013.

39. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS (London, England)*. 2011;25(5):679.
40. Peeters M, Chaix M-L. Origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine: d'où vient-il, où va-t-il? *Virologie*. 2013;17(3):119-31.
41. Toni TdA, Masquelier B, Minga A, Anglaret X, Danel C, Coulibaly A, et al. HIV-1 antiretroviral drug resistance in recently infected patients in Abidjan, Cote d'Ivoire: A 4-year survey, 2002–2006. *AIDS research and human retroviruses*. 2007;23(9):1155-60.
42. Derache A, Maiga A-I, Traore O, Akonde A, Cisse M, Jarrousse B, et al. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(3):456-63.
43. Delgado E, Ampofo WK, Sierra M, Torpey K, Pérez-Álvarez L, Bonney EY, et al. High prevalence of unique recombinant forms of HIV-1 in Ghana: molecular epidemiology from an antiretroviral resistance study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2008;48(5):599-606.
44. Yaotsè DA, Nicole V, Roch NF, Mireille P-D, Eric D, Martine P. Genetic characterization of HIV-1 strains in Togo reveals a high genetic complexity and genotypic drug-resistance mutations in ARV naive patients. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009;9(4):646-52.
45. Moya A, Holmes EC, González-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(4):279.
46. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Current opinion in infectious diseases*. 2006;19(1):1-7.
47. Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends in Genetics*. 2003;19(4):207-16.
48. FITZGIBBON JE, MAZAR S, DUBIN DT. A new type of G→ A hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS research and human retroviruses*. 1993;9(9):833-8.
49. Clavel F, Hoggan M, Willey R, Strebel K, Martin M, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 1989;63(3):1455-9.
50. An W, Telesnitsky A. HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Rev*. 2002;4(4):195-212.

51. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995;267(5197):483-9.
52. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, et al. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. 2013.
53. Faraoni S, Rocchetti A, Gotta F, Ruggiero T, Orofino G, Bonora S, et al. Evaluation of a rapid antigen and antibody combination test in acute HIV infection. *Journal of Clinical Virology*. 2013;57(1):84-7.
54. Palombi L, Marazzi MC, Voetberg A, Magid NA. Treatment acceleration program and the experience of the DREAM program in prevention of mother-to-child transmission of HIV. *Aids*. 2007;21:S65-S71.
55. Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society–USA panel. *Jama*. 2010;304(3):321-33.
56. Organization WH. WHO informal consultation on medium-and long-term priorities for ARV drug optimization: moving towards simplification, harmonization and universal access 29-31 May 2012, Montreux, Switzerland. 2012.
57. Tremblay C. Étude de la résistance des sous-types non-B du VIH-1 aux antirétroviraux au Mali. 2012.
58. SIDA Cdc dcs dlcl. Politique et protocole de prise en charge antiretrovirale du VIH et du SIDA. 2016.
59. Hachiya A, Kodama EN, Schuckmann MM, Kirby KA, Michailidis E, Sakagami Y, et al. K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PloS one*. 2011;6(1):e16242.
60. Iversen A, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *Journal of virology*. 1996;70(2):1086-90.
61. Naeger LK, Margot NA, Miller MD. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2179-84.
62. Brun-Vezinet F, Descamps D, Ruffault A, Masquelier B, Calvez V, Peytavin G, et al. Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *Aids*. 2003;17(12):1795-802.

63. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision. *Journal of virology*. 2002;76(18):9143-51.
64. Ren J, Stammers DK. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus research*. 2008;134(1-2):157-70.
65. Logsdon BC, Vickrey JF, Martin P, Proteasa G, Koepke JI, Terlecky SR, et al. Crystal structures of a multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease reveal an expanded active-site cavity. *Journal of virology*. 2004;78(6):3123-32.
66. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. Special contribution 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*. 2014;22(3):642.
67. Delelis O, Thierry S, Subra F, Simon F, Malet I, Alloui C, et al. Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):491-501.
68. Mouscadet J-F, Delelis O, Marcelin A-G, Tchertanov L. Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: a structural perspective. *Drug Resistance Updates*. 2010;13(4-5):139-50.
69. Douek D. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS reviews*. 2003;5(3):172-7.
70. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS research and human retroviruses*. 2007;23(3):415-26.
71. Tsamis F, Gavrillov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, et al. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology*. 2003;77(9):5201-8.
72. Moore JP, Kuritzkes DR. A piece de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2009;4(2):118.
73. Laakso MM, Lee F-H, Haggarty B, Agrawal C, Nolan KM, Biscione M, et al. V3 loop truncations in HIV-1 envelope impart resistance to coreceptor inhibitors and enhanced sensitivity to neutralizing antibodies. *PLoS pathogens*. 2007;3(8):e117.
74. Lin G, Bertolotti-Ciarlet A, Haggarty B, Romano J, Nolan KM, Leslie GJ, et al. Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop

exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *Journal of virology*. 2007;81(18):9956-66.

75. Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, et al. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *Aids*. 2004;18(13):1787-94.

76. Larder B. Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic drug resistance from genotypes: the virtual phenotype (VirtualPhenotype). *Antiviral Therapy*. 2000;5:63-.

77. Brenner S. Frederick Sanger (1918–2013). American Association for the Advancement of Science; 2014.

78. Ameziane N. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. 2005.

79. Audrey p. mise au point de la technique de genotypage de résistance du vih-1 aux antirétroviraux sur l'ADN proviral au laboratoire de virologie du chu d'angers: université d'Angers; 2016.

80. Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere M, Castro N, et al. Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV medicine*. 2012;13(9):517-25.

81. Fofana D, d'Almeida M, Lambert-Niclot S, Peytavin G, Girard P, Lafia B, et al. Resistance profile and treatment outcomes in HIV-infected children at virological failure in Benin, West Africa. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(11):3143-7.

82. Crowell CS, Maiga AI, Sylla M, Taiwo B, Kone N, Oron AP, et al. High Rates of Baseline Drug Resistance and Virologic Failure Among ART-naïve HIV-infected Children in Mali. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(11):e258-e63.

83. Fofana D, Soulié C, Baldé A, Lambert-Niclot S, Sylla M, Ait-Arkoub Z, et al. High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(9):2531-5.

84. Kebe K, Thiam M, Diagne Gueye NR, Diop H, Dia A, Signate Sy H, et al. High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV type 1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines. *AIDS research and human retroviruses*. 2013;29(2):242-9.

85. Nii-Trebi NI, Ibe S, Barnor JS, Ishikawa K, Brandful JA, Ofori SB, et al. HIV-1 drug-resistance surveillance among treatment-experienced and-naïve patients after the implementation of antiretroviral therapy in Ghana. *PloS one*. 2013;8(8):e71972.
86. Cretin N. Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. 2014.

8. Annexes

Annexe 1 : Procédures opératoires standard pour l'extraction de l'ADN proviral à partir du QIAamp DNA mini Kit

1. Introduction

Ce protocole décrit les procédures d'extraction de l'ADN proviral du VIH-1 à partir des échantillons de sang total collectés sur papier buvard en utilisant le kit QIAGEN.

2. But :

Le but de ce travail est de parvenir à extraire l'ADN et de procéder au génotypage de l'ADN proviral extrait de la souche de VIH.

3. Domaine d'application :

Biologie Moléculaire

4. Conditions de Biosécurité :

Lorsque vous travaillez avec des produits chimiques, portez toujours des blouses appropriées, des gants jetables et des lunettes de protection.

5. Matériels, équipements et réactifs nécessaires

5.1. Composition du coffret QIAGEN

- Colonnes de centrifugation
- Tubes collecteurs de 2 ml
- Tampon de lyse AL
- Tampon de lyse ATL
- Tampon de lavage AW1
- Tampon de lavage AW2
- Tampon d'élution AE
- Protéinase K

5.2. Matériels et réactifs nécessaires non fourni par le kit

- Ethanol (96-100%) *
- Tubes de micro centrifugation de 1,5 ml

- Embouts avec filtre de 100, 200, 1000 µl
- Micro centrifugeuse (avec rotor pour tubes de 2 ml)
- Vortex
- Jets de micropipettes de (100-1000µl ; 100-200µl ; 50µl)
- Perforateur de 3 mm pour DBS
- Deux bains Marie supplémentaires ou blocs chauffants à 85 ° C et 70 ° C
- Un sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS) peut être nécessaire pour certains échantillons.

6. Description de la procédure :

6.1 Préparation et stockage des réactifs :

6.1.1 Préparation et stockage du tampon AL

Mélanger soigneusement le tampon AL en secouant avant utilisation. Le tampon AL est stable pendant 1 an lorsqu'il est stocké à température ambiante entre 15- 25 °C.

NB : N'ajoutez pas de Protéase ou de protéinase K directement au tampon AL.

6.1.2 Préparation et stockage du tampon AW1

Le tampon AW1 est fourni sous forme de concentré. Avant d'utiliser pour la première fois, ajoutez 130ml d'éthanol (96-100%) comme indiqué sur la bouteille.

Le tampon AW1 est stable pendant 1an lorsqu'il est entreposé fermé à température ambiante à 15- 25 °C.

6.1.3 Préparation et stockage du tampon AW2

Le tampon AW2 est fourni sous forme de concentré. Avant d'utiliser pour la première fois, ajoutez 160ml d'éthanol (96-100%) au concentré tampon AW2 comme indiqué sur la bouteille.

Le tampon AW2 est stable pendant 1an lorsqu'il est conservé fermé à température ambiante à 15-25°C.

6.2 Centrifugation

Les colonnes QIAamp Mini s'adaptent à la plupart des tubes de micro centrifugation standard de 1,5 à 2 ml. Des tubes de collecte additionnels de 2 ml sont disponibles

séparément.

La centrifugation des colonnes QIAamp Mini est réalisée à 6000 x g (8000 tr / min) pour réduire le bruit de centrifugation. Centrifuger QIAamp Mini colonnes à pleine vitesse n'affectera pas le rendement en ADN. La centrifugation à des vitesses inférieures est également acceptable, à condition que la quasi-totalité de chaque solution soit transférée à travers la membrane QIAamp. Toutes les étapes de centrifugation doivent être effectuées à température ambiante (15-25° C).

6.3 Traitement de colonnes QIAamp mini à l'aide d'une micro centrifuge

Fermer la colonne QIAamp Mini avant de la placer dans la micro centrifugeuse. Centrifuger comme décrit.

- Retirez la colonne QIAamp Mini et le tube collecteur de la micro centrifugeuse.

Placez la colonne QIAamp Mini dans un nouveau tube de collecte. Jeter le filtrat et le tube de collecte.

Notez que le filtrat peut contenir des déchets dangereux et doit être éliminé de manière appropriée.

- Ouvrez une seule colonne QIAamp Mini à la fois et veillez à ne pas générer d'aérosols.
- Pour un traitement parallèle efficace de plusieurs échantillons, remplissez une crémaillère avec des tubes de prélèvement auxquels les colonnes QIAamp Mini peuvent être transférées après centrifugation. Les tubes de collecte usagés contenant le filtrat peuvent être jetés et les nouveaux tubes de collecte contenant les colonnes QIAamp Mini peuvent être placés directement dans la micro centrifugeuse.

Points importants avant le démarrage

- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à température ambiante (15-25 ° C).
- Préparer un bain-marie à 85 ° C pour l'étape 3, un bain-marie à 56 ° C pour l'étape 6 et un bain-marie à 70 ° C pour l'étape 9.
- Equilibrer le tampon AE à température ambiante (15-25 ° C) pour l'élution à l'étape 10.
- Assurez-vous que le tampon AW1 et le tampon AW2 ont été préparés conformément aux instructions.
- Si un précipité s'est formé dans le tampon AL ou le tampon ATL, dissoudre par incubation à 56°C.

6.4 PROCEDURE

1. Placez 3 cercles de 3 mm découpés à partir d'une tache de sang séchée dans un tube de micro centrifugeuse de 1,5ml.
2. Ajoutez 180µl de tampon ATL.
3. Incuber à 85°C pendant 10 min.
4. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.
5. Ajouter 20µl de solution mère de protéinase K.
6. Mélanger par vortex, et incuber à 56 ° C pendant 1h.
7. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.

Remarque : L'addition de la protéinase K est essentielle.

8. Ajouter 200µl de tampon AL à l'échantillon.
9. Bien mélanger par vortex, et incuber à 70°C pendant 10min.
10. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.

Remarque :

Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel que l'échantillon et le tampon AL soient mélangés immédiatement et complètement

11. Ajouter 230µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon, et bien mélanger par vortex.
12. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.

NB : Il est essentiel que l'échantillon et l'éthanol soient bien mélangés.

13. Appliquer soigneusement le mélange de l'étape 11 à la colonne de centrifugation QIAamp Mini (dans un tube de prélèvement de 2ml) sans mouiller le rebord.
14. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min.
15. Placez la colonne de spin QIAamp Mini dans un tube de collecte propre de 2 ml (fourni) et jetez le tube contenant le filtrat.

NB : Fermer chaque colonne de spin QIAamp Mini pour éviter la formation d'aérosols pendant la centrifugation.

16. Ouvrir soigneusement la colonne de rotation QIAamp Mini et ajouter 500µl de tampon AW1 sans mouiller la jante.
17. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.
18. Placez la colonne de rotation QIAamp Mini dans un tube de collecte propre de 2 ml (fourni) et jetez le tube de collecte contenant le filtrat. *

- 19.** Ouvrir soigneusement la colonne de rotation QIAamp Mini et ajouter 500µl de tampon AW2 sans mouiller la jante.
- 20.** Fermer le capuchon et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g ;14 000 tr/min) pendant 3 min.
- 21. Recommandé :** Placez la colonne de rotation QIAamp Mini dans un nouveau tube de collecte de 2ml (non fourni) et jetez l'ancien tube de collecte avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 min.

Cette étape contribue à éliminer les risques d'accumulation du tampon AW2.

- 22.** Placez la colonne de spin QIAamp Mini dans un tube de micro centrifugeuse de 1,5 ml (non fourni) et jetez le tube de collecte contenant le filtrat.
- 23.** Ouvrir soigneusement la colonne de rotation QIAamp Mini et ajouter 100 µl de tampon AE ou d'eau distillée.
- 24.** Incuber à température ambiante (15-25°C) pendant 1 min, puis centrifuger à 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min.

Annexe 2

Liste des matériels utilisés

Pour réaliser les tests de génotypage, les matériels suivant ont été utilisés :

- Une enceinte de sécurité (hotte) ;
- Un bain mairie ;
- Des plaques chauffantes ;
- Un jeu de pipettes de 2.5 ; 5 ;10 ; 20, 100 ;200 ; 1000 μ l ;
- Des embouts de 0.5-10 μ l ; 0.5- 20 μ l ; 10 -100 μ l ; 100-1000 μ l ;
- Des microtubes de 0.5 ml ; 1.5ml ; 2 ml ;
- Des portoirs
- Des Thermocycleurs ;
- Un Dispositif d'électrophorèse (cuve, support du gel, peignes, générateur, transilluminateur UV) ;
- Un Dispositif machery Nagel (pompe, tuyaux) ;
- Une Centrifugeuse réfrigéré ;
- Un séquenceur ABI 3500 genetic analyseur ;

Evaluation de la résistance du VIH- 1 aux antirétroviraux chez les nouveau-nés de mère séropositive au Mali.

Annexe 3

Liste des médicaments antirétroviraux

Dénomination Commune Internationale (DCI)	Abréviation	Nom commercial
Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse		
emtricitabine	FTC	EMTRIVA®
lamivudine	3TC	EPIVIR®
zidovudine	AZT	RETROVIR®
didanosine	ddI	VIDEX®
ténofovir	TDF	VIREAD®
stavudine	d4T	ZERIT®
abacavir	ABC	ZIAGEN®
Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse		
étravirine	ETR	INTELENCE®
éfavirenz	EFV	SUSTIVA®
névirapine	NVP	VIRAMUNE®
rilpivirine	RPV	EDURANT®
Associations d'inhibiteurs de la transcriptase inverse		
lamivudine + zidovudine	3TC + AZT	COMBIVIR®
lamivudine + zidovudine + abacavir	3TC + AZT + ABC	TRIZIVIR®
emtricitabine + ténofovir	FTC + TDF	TRUVADA®
emtricitabine + ténofovir + éfavirenz	FTC + TDF + EFV	ATRIPLA®
abacavir + lamivudine	ABC + 3TC	KIVEXA®
emtricitabine + rilpivirine + ténofovir	FTC + RPV + TDF	EVIPLERA®
Inhibiteurs de la protéase		
tipranavir	TPV	APTIVUS®
indinavir	IDV	CRIXIVAN®
saquinavir	SQV	INVIRAS®
lopinavir	LPV	KALETRA®
darunavir	DRV	PREZISTA®
atazanavir	ATV	REYATAZ®
fosamprénavir	FPV	TELZIR®
ritonavir (booster)	RTV	NORVIR®
Inhibiteurs de l'intégrase		
raltégravir	RAL	ISENTRESS®
elvitégravir	EVG	JTK-303
Dolutégravir	DTG	TIVICAY®
Inhibiteurs du récepteur CCR5		
maraviroc	MVC	CESENTRI®
Inhibiteur de fusion		
enfuvirtide	T-20	FUSEON®

Annexe 4

Liste des acides aminés

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

Fiche Signalétique

Nom :DIALLO

Prénom :Fatoumata Issa

Titre : Evaluation de la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les nouveau-nés de mère séropositive au Mali

Année de soutenance : 2017-2018

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali.

Adresse électronique : fatoumatad513@gmail.com

Résumé

Au Mali, en 2016 le nombre de personnes adultes âgés de 15 ans et plus vivant avec le VIH était estimé à 110 000, les enfants de 0 à 14 ans restent touchés par cette pandémie avec 12000 enfants infectés. Dans cette population fragile, la résistance aux ARV est encore plus inquiétante et reste mal évaluée. Le but de cette étude était d'évaluer la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux dans une population pédiatrique au Mali.

L'étude a porté sur 108 DBS (VIH+) confectionnés à partir de sang prélevé chez des enfants âgés de 0 à 18 mois nés de mères séropositives au VIH-1. Les ADN proviraux ont été extraits par méthode chimique, puis amplifiés par PCR nichée et séquencés par la méthode de Sanger à l'aide du ABI 3500 genetic analyser selon la technique ANRS au laboratoire de bactériologie virologie de l'INRSP. Les séquences des gènes de la RT, de la prot et de l'intégrase ont été analysées puis interprétées par la version récente de l'algorithme de Stanford.

A l'issue de nos travaux, les résultats suivants ont été obtenus :

Le sexe féminin était prédominant avec 47,2 %. L'âge médian était de 9 mois. Sur les 108 échantillons, 40 gènes de reverse transcriptase, 29 gènes de protéases et 16 gènes d'intégrases ont pu être amplifiés. Le taux global de mutations de résistance associées aux différentes classes étudiées était de 16,66%. La présence d'au moins une mutation de résistance associée aux INNTI, aux INTI et aux IP était de 18,75%, 12,5 %, 6,89% respectivement. Nous avons retrouvé des mutations de résistance associées aux INNTI, aux INTI et aux IP. Ainsi pour les INTI, les mutations M41L, M184V et Y115F ont été retrouvées avec une fréquence de 6,3% chacune ; pour les INNTI, les mutations K103N (12,5%), G190A (6,3%), V108I (6,3%), E138Q (6,3%), Y181C (6,3%), H221Y (6,3%) ont été retrouvées. Neuf mutations mineures ont été observées pour les IP (F53L, I50M, M46R, G48E, V32L V32I, D30N, avec 3,4% chacune) et deux mutations majeures V82F, N88D ont également été observées pour les IP avec 3,4% de fréquence. Le sous type CRF02_AG a été le plus fréquent à 84%.

Ce travail a montré un niveau modéré de 16,66% de mutations de résistance associées aux différentes classes d'ARV. Les INNTI, restent la classe la plus touchée avec 18,75%. Nous n'avons enregistré aucune mutation majeure de résistance associées aux I.INT. Ainsi la faible résistance aux IP et l'absence de la résistance aux I.INT supportent l'utilisation de ces molécules chez les enfants.

Mots clefs : ARV ; Mutations ; Nouveau-nés ; Résistance ; VIH

Abstract

In Mali, in 2016 the number of adults aged 15 and over living with HIV was estimated at 110,000, children aged 0 to 14 remain affected by this pandemic with 12,000 infected children. In this fragile population, resistance to

ARVs is even more worrying and remains poorly evaluated. The purpose of this study was to evaluate HIV-1 resistance to antiretrovirals in a pediatric population in Mali.

The study involved 108 DBS (HIV +) made from blood taken from children aged 0 to 18 months born to HIV-1 infected mothers. The proviral DNAs were extracted by chemical method, then amplified by nested PCR and sequenced by the Sanger method using the ABI 3500 genetic analyzer according to the ANRS technique at the INRSP virology bacteriology laboratory. The gene sequences of RT, prot, and integrase were analyzed and interpreted by the recent version of the Stanford algorithm.

At the end of our work, the following results were obtained:

The female sex was predominant with 47.2%. The median age was 9 months. Of the 108 samples, 40 reverse transcriptase genes, 29 protease genes and 16 integrase genes could be amplified. The overall rate of resistance mutations associated with the different classes studied was 16.66%. The presence of at least one resistance mutation associated with NNRTIs, NRTIs and PIs was 18.75%, 12.5%, 6.89%, respectively. We found resistance mutations associated with NNRTIs, NRTIs and PIs. Thus for NRTIs, mutations M41L, M184V and Y115F were found with a frequency of 6.3% each; for NNRTIs, mutations K103N (12.5%), G190A (6.3%), V108I (6.3%), E138Q (6.3%), Y181C (6.3%), H221Y (6, 3%) were found. Nine minor mutations were observed for PIs (F53L, I50M, M46R, G48E, V32L V32I, D30N, with 3.4% each) and two major mutations V82F, N88D were also observed for PIs with 3.4% frequency. The CRF02_AG subtype was the most common at 84%.

This work showed a moderate level of 16.66% of resistance mutations associated with the different classes of ARVs. NNRTIs remain the most affected class with 18.75%. We did not record any major resistance mutations associated with I.INT. Thus the low resistance to PIs and the lack of resistance to I.INT support the use of these molecules in children.



SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence des maîtres de la Faculté
et de mes condisciples :
D'honorer ceux qui m'ont instruit dans
Les préceptes de mon art et de leur Témoigner
ma reconnaissance en
Restant fidèle à leur enseignement.
D'exercer, dans l'intérêt de la santé
Publique, ma profession avec
Conscience et de respecter non Seulement la
législation en
Vigueur, mais aussi les règles de L'honneur, de
la probité et du Désintéressement.
De ne jamais oublier ma responsabilité
Et mes devoirs envers le malade
Et sa dignité humaine ; en aucun
Cas, je ne consentirai à utiliser
Mes connaissances et mon état pour
Corrompre les mœurs et favoriser Des actes
criminels.
Que les hommes m'accordent leur Estime si je
suis fidèle à mes Promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et Méprisé de
mes confrères si j'y Manque.*

