

MINISTRE DE L'EDUCATION
NATIONALE

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE – UN BUT – UNE FOI



UNIVERSITES DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET
DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO
FACULTES DE PHARMACIE

Année Universitaire : 2017-2018

N°.....

THESE

*Evaluation de la résistance primaire du
VIH-1 aux inhibiteurs d'Intégrase*

Présentée et soutenue publiquement Le:21/12/2018 devant le jury

De la faculté de pharmacie Par :

GOITA Dorcas Gnékoun DAO

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

JURY

Président :Pr. Hamar Alassane TRAORE

Membre :Dr Abdoulaye Mamadou TRAORE

Membre: Dr Ibrahima GUINDO

Directeur : Pr. Daouda Kassoum MINTA

Co-Directeur : Dr Almoustapha Issiaka MAIGA

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIE DE BAMAKO

DOYEN : 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 AGREGÉ/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	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	Biostatistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
Mme. Dinkorma	OUOLOGUEM	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	HADARA	Pharmacognosie

Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Hamma 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	DACKOUCO	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



*DEDICACES ET
REMERCIEMENTS*

DEDICACES

A mon père Dr Timothée DAO

Papa c'est en voulant suivre tes traces que j'ai choisi de faire cette Faculté de Pharmacie pour aider mon prochain du mieux que je peux. Tu as sauvé tellement de vie, tu t'es sacrifié tellement de fois pour les autres mais et malgré tout tu as toujours été là pour nous. Papa ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans ton soutien. Je prie JEHOVA qu'il te garde longtemps en bonne santé auprès de nous. Amen

A ma mère TATA Esther DIARRA

Maman chérie, ma meilleure amie, mon soutien ma force, je ne cesserais jamais de remercier Dieu de m'avoir donné une telle mère. Tu es unique pour moi Maman, tu as été là à chaque étape de ma vie, même, quand tout semblait confus, tu m'as toujours soutenue dans mes prises de décisions. Ton amour inconditionnel et tes prières me comblent de bonheur. Ce travail est le fruit de tes efforts. Que JEHOVA te garde longtemps en bonne santé auprès de nous, amen

A mes frères

Daniel, Abraham DAO vous m'avez toujours encouragé tout au long de ce parcours. Que le Seigneur vous guide chaque jour de votre vie. Merci pour votre présence dans ma vie. Soyez bénis.

A ma sœur Tabita DAO, BBtabi ma première fille petite coquine, tu m'as fait sourire tellement de fois, merci pour ta présence dans ma vie. Soit heureuse

REMERCIEMENTS

A Dieu le Père, le Fils et le Saint Esprit

Psaume 8 :10

Merci JEHOVA Père de grâce et de bonté, je vous suis éternellement reconnaissante de m'avoir guidé tout au long de ce travail.

Je vous le dédie en vous priant d'être à jamais mon bouclier, ma forteresse, celui qui restaure mon âme et qui me guide vers des eaux paisibles.

A mes Tontons

David, Etienne, Paul et Robert, je vous suis très reconnaissante pour vos soutiens et encouragement envers moi tout au long de ce cycle. Que Dieu vous donne longue vie.

A mes Tantes

Awa Dao, Tabita Sogoba qui a rejoint le Seigneur, Assetou Sidibé, Jokebed Théra et Sitan Dao, chères tantes vous avez été des mères pour moi, je vous remercie pour vos prières et encouragement. Que Dieu vous donne longue vie.

A mes cousins

Sylvain, Simon, Micaeil, Michel, Mathieu, Luc,... merci pour votre amour. Soyez bénis.

A mes cousines

Léa, Martine, Elisabeth, Awa Christine, Catherine, Prisca,... merci pour votre soutien et vos mots d'amour. Que Dieu garde toujours Cette grande famille unie.

A ma moitié Drissa David GOITA

Mon cœur merci pour ta présence dans ma vie, tu as cru et mis ta confiance en moi. Tu as été mon pilier durant toutes ces années, ton soutien et tes encouragements ne m'ont jamais fait défaut. Merci d'être celui que tu es pour moi merci pour ta patience et pour cet amour immense que tu portes à mon égard à chaque instant. Je rends grâce à Dieu pour t'avoir mis sur mon chemin. Ce travail est le tien mon *DG*.

A mes aînés, camarades et amies, Dolo, Josué, Issa, Tata, Adam, Abdourahamane et Arkiétou à notre groupe d'exercice merci pour vos conseils encouragement et pour tous les moments de bonheur que nous avons eu à partager.

Au Professeur Souleymane Diallo et à tout le personnel du laboratoire de recherche SEREFO/UCRC, particulièrement à l'équipe d'épidémiologie moléculaire merci de m'avoir accepté dans cette grande famille. Vous m'avez soutenu et guidé tout au long de ce travail. Recevez ici ma sincère reconnaissance.

A Dr Almoustapha Maiga, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe. Vous avez été un guide un ami et un conseiller. Merci pour tout le temps que vous avez pris à m'aider dans la réalisation de ce travail, et pour votre présence durant les moments difficiles. Je vous serais toujours reconnaissante. Que Dieu vous Bénisse.



*HOMMAGES AUX
MEMBRES DU JURY*

A notre Maître et Président du Jury

Professeur Hamar Alassane TRAORE

- Professeur titulaire de Médecine Interne
- Chef de service de Médecine Interne du CHU du Point G
- Président de la Société Africaine de Médecine Interne (SAMI)
- Ancien Président de la commission médicale d'établissement (CME) du CHU du Point G
- Coordinateur du Diplôme d'Etude Spéciale de médecine interne de la FMOS
- Responsable de l'enseignement de la thérapeutique et de la sémiologie médicale à la FMOS de Bamako
- Membre titulaire de l'Académie des Sciences du Mali
- Chevalier de l'Ordre National du Mali

Cher Maître,

C'est un grand privilège de vous avoir comme Président de ce jury. Nous avons été honorés de la confiance que vous nous avez faite en acceptant de présider ce jury. Vos qualités d'homme scientifique, votre sens de la perfection, votre rigueur dans la démarche scientifique, font de vous un maître exemplaire.

Permettez-nous en ce jour de vous adresser nos vifs remerciements.

A notre Maître et Juge

Dr Abdoulaye Mamadou TRAORE

- Spécialiste des maladies infectieuses
- Certifié de Santé Publique
- Diplômé de Management de Projet et de lutte antipaludique
- Certifié de One Health économie de la Santé
- Maître assistant à la FMOS en maladies infectieuses
- Secrétaire général de la Société malienne de contrôle de Résistance aux Antimicrobien (SOMARAM)
- Chargé de cours à l'INFSS, membre de plusieurs sociétés savantes

Chère maître,

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Votre accueil très aimable, votre volonté d'enseigner et votre profond humanisme nous ont beaucoup touchés. Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude.

A notre Maître et Juge

Dr Ibrahima GUINDO

- Pharmacien biologiste
- Chef du service de bactériologie – virologie à l'INRSP
- Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP
- Maître-assistant de Bactériologie Virologie à la faculté Pharmacie de Bamako.

Chère maître, nous vous remercions de l'honneur que vous nous faite en acceptant de juger ce travail. Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration. Qu'il soit permis, chère Maître, de vous exprimer notre sincère reconnaissance, notre profond respect et notre plus grande estime.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Dr Almoustapha Issiaka MAIGA

- Responsable de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV du Centre de Recherche SEREFO
- Chef du Département de Biologie Médicale du CHU Gabriel Touré
- Secrétaire General de l'Association Africaine de lutte contre la Résistance aux Antimicrobiens (SOMARAM)
- Membre de plusieurs sociétés savantes internationales de lutte contre le VIH dans le monde
- Enseignant vacataire à la Faculté de Pharmacie
- Chargé de Recherche

Cher maître,

Nous avons été très honorés de travailler à vos côtés, vos apports et conseils tout au long de ce travail nous ont très touché. Votre disponibilité, votre générosité, votre modestie et vos qualités d'homme scientifique font de vous un maître distingué.

Veillez accepter cher maître l'expression de nos sincère remerciements et notre gratitude.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Daouda Kassoum MINTA

- Professeur Titulaire des universités
- Agrégé de Maladies Infectieuses et Tropicales
- Directeur du Centre d'excellence de lutte contre le VIH
- Chargé de cours de Parasitologie et de Thérapeutique à la FMOS
- Président de la société Malienne de Contrôle des Résistances aux antimicrobiens (SOMARAM)

Cher maître,

C'est un privilège et un grand honneur que vous nous avez fait en acceptant de diriger ce travail, vos compétences professionnelles, vos qualités scientifiques et humaines, votre disponibilité et votre amabilité, font de vous un maître respecté.

Recevez cher maître avec tout le respect et toutes les considérations nos humbles remerciements.



*TABLE DES
MATIERES*

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIFS	3
II.1. OBJECTIF GENERAL :	3
II.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :	3
III.1. Caractéristiques virologiques	4
III.2. Classification	4
III.3. Structure de la particule virale.....	5
III.4. Génome du VIH-1	6
III.5. Cycle répliatif du VIH-1	9
III.6. Rôle de l'intégrase du VIH-1	11
III.7. Physiopathologie de l'infection à VIH-1.....	12
III.7.1. La primo-infection	13
III.7.2. La phase asymptomatique	13
III.7.3. La phase symptomatique ou phase SIDA.....	13
III.8. Mode de transmission du VIH-1	14
III.9. Diversité génétique.....	15
III.10. EPIDEMIOLOGIE	17
III.11. TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL.....	18
III.11.1. Les différentes classes thérapeutiques	19
III.11.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	19
III.11.1.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques ou non-nucléotidiques (INNTI)	19
III.11.1.3. Les inhibiteurs de la protéase (IP)	20
III.11.1.4. Les Inhibiteurs de fusion.....	20
III.11.1.5. Les Inhibiteurs d'entrée	21
III.11.1.6. Les Inhibiteurs de l'intégrase	22
III.11.2. Recommandation pour traiter	23

III.12. Schémas thérapeutique	23
III.13. ECHEC THERAPEUTIQUE	24
III.14. La résistance du VIH-1 aux antirétroviraux	25
III.15. Méthodes d'identification des mutations de résistances aux ARV :	29
IV. METHODOLOGIE.....	31
IV.1. Cadre et lieu d'étude	31
IV.2. Type et période d'étude.....	32
IV.3. Echantillon	32
a) Population d'étude	32
b) Critères d'inclusion	33
c) Critères de non inclusion	33
IV.4. Méthode utilisée	33
IV.5. Interprétation des résultats	41
IV.6. ANALYSE DES DONNEES	42
IV.7. ASPECT ETHIQUE	43
V. RESULTATS	42
VI. COMMENTAIRE ET DISCUSSION	48
LIMITE DE L'ETUDE	53
VII. CONCLUSION	52
VIII. RECOMMANDATIONS	53
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55
Annexe	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des rétrovirus basé sur l’alignement des séquences de la RT et de l’IN.....	5
Figure 2: Structure du VIH (12).....	6
Figure 3: Structure de l’ADN proviral du VIH-1 (25).....	9
Figure 4 : Cycle réplcatif du VIH-1 (33).	10
Figure 5 : Les différentes étapes de l’intégration (42).....	12
Figure 6: stades caractéristiques de l’infection à VIH-1 (45).....	14
Figure 7 : Arbre phylogénétique des VIH (49).....	16
Figure 8: Répartition géographique des Personnes vivant avec le VIH dans le monde (52)...	18
Figure 9: Les Sites d’Action des Antirétroviraux (61).....	23
Figure 10 : Prévalence des différents sous types de VIH-1 identifiés par l’algorithme de l’ANRS.....	43
Figure 11 : Prévalence des différentes mutations mineures identifiées.	45
Figure 12 : Prévalence des mutations mineures en fonction des sous-types de VIH-1 identifiés.....	46
Figure 13 : Prévalence des trois mutations qui ont conféré de la résistance aux INI en fonction des sous-types de VIH-1 identifiés.....	47
Figure 14 : Prévalence de la résistance des INI selon les algorithmes ANRS, Stanford et Réga.....	48
Figure 15 : Prévalence de la résistance des inhibiteurs d’intégrase en fonction des sous-types de VIH-1 identifiés selon l’algorithme de l’ANRS.....	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes amorces utilisées pour la RT-PCR et la PCR nichée	36
Tableau II : Composition du mix réactionnel pour un échantillon pour la RT-PCR	36
Tableau III : Programme du thermocycleur pour la RT-PCR.....	37
Tableau IV : Composition du mix réactionnel pour un échantillon pour la PCR nichée.....	37
Tableau V : Programme du thermocycleur pour la PCR nichée	38
Tableau VI : Préparation du mix pour la migration sur gel.....	38
Tableau VII : Mix réactionnel BigDye Terminator pour un échantillon pour la réaction de séquence.	40
Tableau VIII : Programme du thermocycleur pour la réaction de séquence.....	40
Tableau IX: Prévalence des deux polymorphismes T124A et T206S en fonction des différents sous-types VIH-1 identifiés.	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : Abacavir

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA

ARN : Acide Ribonucléique

ARV : Antirétroviral

ATV : Atazanavir

AZT / ZDV : Zidovudine

BIC : Bictégravir

CA : Capside

CAB : Cabotégravir

CD4 : Cluster of Differentiation 4 / Caractère de Différenciation 4

CESAC : Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseil

CPI : Complexe de Pré-Intégration

CRF : Circulating Recombinant Form / Forme recombinantes circulante

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

DRV : Darunavir

DTG : Dolutégravir

EDSM-V : Cinquième Enquête démographique et de Santé du Mali

EFV : Efavirenz

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Env : Enveloppe

EVG : Elvitégravir

3TC : Lamivudine

FAPH : Faculté de Pharmacie

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

FPV : Fosamprénavir

FTC : Emtricitabine

Gag: Group specific antigen / Antigène de Groupe

Gp: Glucoprotéine

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy

HTLV: Human Leukemia Virus

IDV: Indinavir

INI : Inhibiteur d'Intégrase

INTI : Inhibiteur Nucléosidique / Nucléotidique de la Transcriptase Inverse

INNTI : Inhibiteur Non Nucléosidique / Nucléotidique de la Transcriptase Inverse

IP : Inhibiteur de Protéase

LPV : Lopinavir

LTR : Long Terminal Repeat

MA : Matrice

MVC : Maraviroc

NC : Nucléocapside

NFV : Nelfinavir

NVP : Nevirapine

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONUSIDA : Organisation des Nations Unies pour la lutte contre le SIDA

PCR : Polymerase Chain Reaction / Réaction de Polymérisation en Chaîne

Pol : Polymérase

PPE : Prophylaxie Post-Exposition

PrEP : Prophylaxie Pré-Exposition

PVVIH : Personne Vivant avec le VIH

RAL: Raltégravir

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

RTV : Ritonavir

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

TAR : Traitement Antirétroviral

TDF : Tenofovir

TI/RT : Transcriptase Inverse / Reverse Transcriptase

USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine type 1



INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) responsable du syndrome de l'immunodéficience acquis (SIDA) est l'un des problèmes majeurs de santé publique dans le monde depuis sa découverte. Isolé pour la première fois à l'institut Pasteur de Paris en 1983 par l'équipe de Luc Montagnier et F. Barré-Sinoussi (1), l'infection à VIH a connu une expansion sans précédente, avec une importante disparité géographique, l'Afrique subsaharienne demeurant la région du monde la plus touchée, avec 69,64% sur le total mondial soit 25,7 millions de personnes vivant avec le VIH (2).

D'après le dernier rapport de l'Organisation mondiale de la Santé, en fin 2017, 36,9 millions de personnes dans le monde étaient porteuses du VIH avec 1,8 million de personne nouvellement infectées soit 4,87% et 940 000 personnes sont décédées à cause du Sida soit 2,54%. 21,7 millions de personnes recevaient des traitements ARV dans le monde (2).

Au Mali, la cinquième enquête démographique et de santé (EDS M-V) réalisée en 2012/2013 dans la population générale donne une prévalence de 1,1% (3).

La remarquable variabilité génétique du VIH et son importante capacité d'évolution, du fait d'un haut niveau d'adaptation du virus à son hôte contribuent à l'entretien de l'épidémie et de la diversité génétique de ce virus. A ce jour, deux types de VIH ont été identifiés le VIH-1 et le VIH-2 (4,5). Le VIH-1 est le plus prévalent et est subdivisé en 4 groupes : M, O, N et P, selon la chronologie de leur découverte. La grande majorité des souches responsables de la pandémie appartiennent au groupe M, dans lequel on distingue plusieurs sous types et près de 20% des isolats sont recombinants, avec des parties du génome appartenant à des sous types différents (6). Le sous-type B est très prédominant en Europe, aux USA et en Australie alors que le sous-type C qui est le plus majoritaire dans le monde se trouve prévalent en Afrique Australe et en Afrique du Sud.

Ainsi, les virus issus de la recombinaison entre des sous-types du groupe M ont été classés comme des formes recombinantes circulantes (en anglais Circulating Recombinant Form - CRF). En Octobre 2018, le nombre de CRF recensées est de 96 pour le VIH-1 et un CRF pour le VIH-2, certains CRF du VIH-1 groupe M sont devenues prédominantes dans certaines régions du globe comme les CRF02_AG et CRF01_AE, circulant de manière majoritaire en Afrique de l'ouest surtout au Mali 70-80% respectivement (7,8).

Depuis 2001, la montée en puissance de l'accès aux antirétroviraux (ARV) a permis d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients vivant avec le VIH dans les pays à ressources limitées et plus particulièrement au Mali. La majorité des patients demeure sous une combinaison fixe associant 2 INTI et 1 INNTI.

Malgré l'efficacité de ces traitements, des résistances apparaissent pour diverses raisons pharmacologiques (effets secondaires des médicaments, concentrations suboptimales consécutives à des difficultés d'observance ou des interactions médicamenteuses, mauvaise absorption) et/ou préexistence de souches virales résistantes aux médicaments ou la sélection des souches multi résistantes due à la pression médicamenteuse et une faible barrière génétique de l'ARV utilisé. Dans ces cas, le virus continue à se répliquer sous traitement, entraînant un échec virologique aux traitements (9). Cet échec peut entraîner un développement de la résistance secondaire et la transmission des virus résistants appelée résistance primaire.

La classe des inhibiteurs d'intégrase (INI) a été récemment commercialisée et on note l'Elvitégravir (EVG), le Raltégravir (RAL) et le Dolutégravir (DTG). Ils constituent une classe majeure dans l'arsenal thérapeutique car ce sont des molécules puissantes avec un bon profil de tolérance. Ces composés inhibent l'action de l'intégrase, enzyme virale indispensable à la réplication ayant pour rôle spécifique l'intégration de l'ADN viral dans le génome humain, étape nécessaire à l'infection productive par le VIH (10,11). Cette cible s'est révélée être très intéressante car elle ne possède pas d'homologue enzymatique chez l'homme (12). Malgré leur grande efficacité, on sait que la résistance aux INI se manifeste, conduisant à l'échec du traitement. A ce jour, des mutations ont été associées à la résistance des INI, bien que beaucoup d'entre elles soient pensées être des polymorphismes. Certaines de ces mutations polymorphiques jouent un rôle important dans le sauvetage viral et peuvent augmenter le niveau de résistance. Aujourd'hui le Raltégravir, est utilisé comme traitement de 3^{ème} ligne. Certains de ces patients pourraient être en échec de cette molécule et transmettre des virus résistants aux INI. Les récentes recommandations de l'OMS sont en faveur de l'introduction de cette classe en traitement de 1^{ère} ligne comme le DTG.

Il nous paraît judicieux d'estimer la prévalence de la résistance primaire à cette classe d'ARV avant leur introduction en traitement de 1^{ère} intention.



II. OBJECTIFS

II.1. OBJECTIF GENERAL :

Analyser la prévalence des virus résistants aux inhibiteurs de l'intégrase chez les patients VIH-1 naïf de traitement antirétroviraux.

II.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Déterminer la prévalence de la résistance primaire aux inhibiteurs de l'intégrase chez les personnes infectées par le VIH-1 et naïf de traitement ARV
- Décrire les mutations et les profils de résistances aux INI
- Déterminer la diversité génétique du VIH-1 circulant au Mali
- Comparer les différents algorithmes (ANRS, STANFORD, REGA)



GENERALITES

III. GENERALITE SUR LE VIH

III.1. Caractéristiques virologiques

Le virus de l'immunodéficience Humaine est un virus à ARN de polarité positive, enveloppé. Il appartient à la famille des Retroviridae, à la sous-famille des Orthoretrovirinae et au genre Lentivirus. Cette famille se distingue par la présence d'une enzyme virale caractéristique: la Transcriptase Inverse (TI) qui est responsable de la transcription de l'ARN monocaténaire du virus en ADN viral bicaténaire. Cet ADN viral peut alors s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte sous le nom de provirus (1).

III.2. Classification

Il existe des dizaines de rétrovirus capables d'infecter toutes les espèces animales. En fonction de leurs pathogénicités, morphologies, structure du génome et de leurs propriétés antigéniques ils ont été subdivisés en deux sous-familles et sept genres :

- La sous-famille des Orthoretrovirinae rassemble les Alpharetrovirus, les Betaretrovirus, les Gammaretrovirus, les Deltaretrovirus, les Epsilonretrovirus et les Lentivirus ;
- La sous-famille des Spumavirinae comprend un seul genre : les Spumavirus.

Les Alpharetrovirus, les Betaretrovirus, les Gammaretrovirus, les Deltaretrovirus, les Epsilonretrovirus induisent chez leurs hôtes des tumeurs et des leucémies. Les virus de la leucémie à cellules T de l'adulte ou Human T leukemia virus (HTLV), identifiés chez l'homme en 1980 sont classés dans les Deltaretrovirus.

Il existe deux types d'HTLV : HTLV-1 et HTLV-2

Les Lentivirus dont font partie les VIH, détruisent les cellules qu'ils infectent et ont d'abord été décrits chez les Ongulés où ils entraînent des infections lentes du système nerveux central, du poumon ou des articulations.

Les Spumavirus sont des découvertes de cultures cellulaires de primates et, jusqu'à présent, sont considérés comme non pathogènes pour leur hôte.

Retroviridae

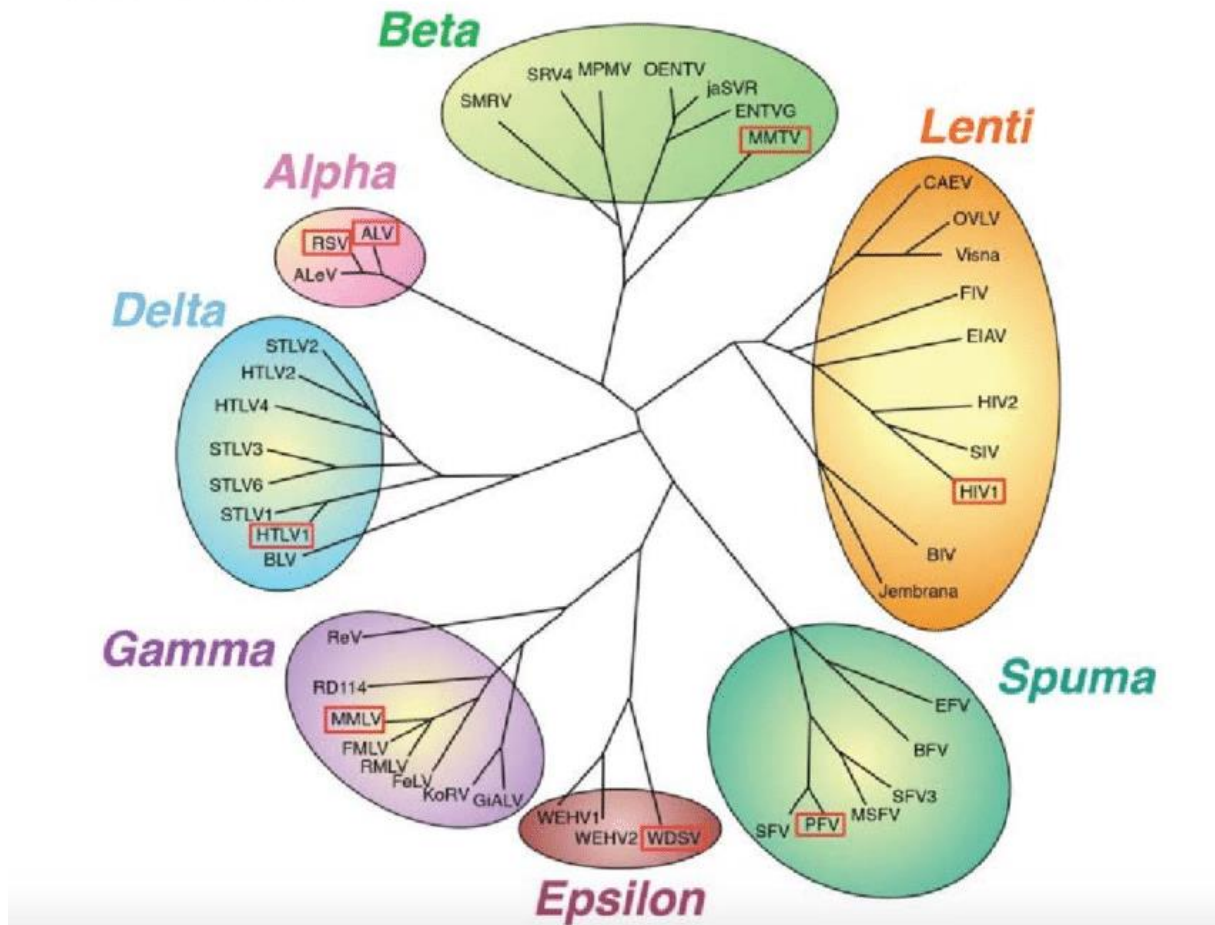


Figure 1 : Arbre phylogénétique des rétrovirus basé sur l'alignement des séquences de la RT et de l'IN (13).

III.3. Structure de la particule virale

La particule virale VIH-1 mesure entre 90 et 120 nanomètre de diamètre, produit par bourgeonnement membranaire de la cellule hôte. Son enveloppe contient des trimères de deux glycoprotéines (gp) virales : la gp120 responsable de l'interaction du virus avec le récepteur CD4+ et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 et la gp41 (transmembranaire) qui assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible (14).

Le core (cylindrique) du virus protégée par son enveloppe renferme une matrice (MA) composée de protéine p17 et une capsid (CA) composée de protéines p24. Le génome du VIH1, contenu dans la capsid et associé à la nucléocapsid (NC p7) est composé de 2 molécules identiques d'ARN monocaténaire de polarité positive reliées entre elles de façon non covalente en 5'.

L'ARN viral est encadré de séquences répétées « R », de la région U5 en 5' et U3 en 3' qui sera lors de la transcription inverse convertie en ADN permettant la création aux extrémités de séquences répétées non codantes appelées LTR (Long Terminal Repeat) composé des régions U3, R et U5 jouant un rôle crucial dans la réplication virale.

Le core du VIH renferme également trois enzymes indispensables à sa réplication virale : la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN), et la protéase (PR).

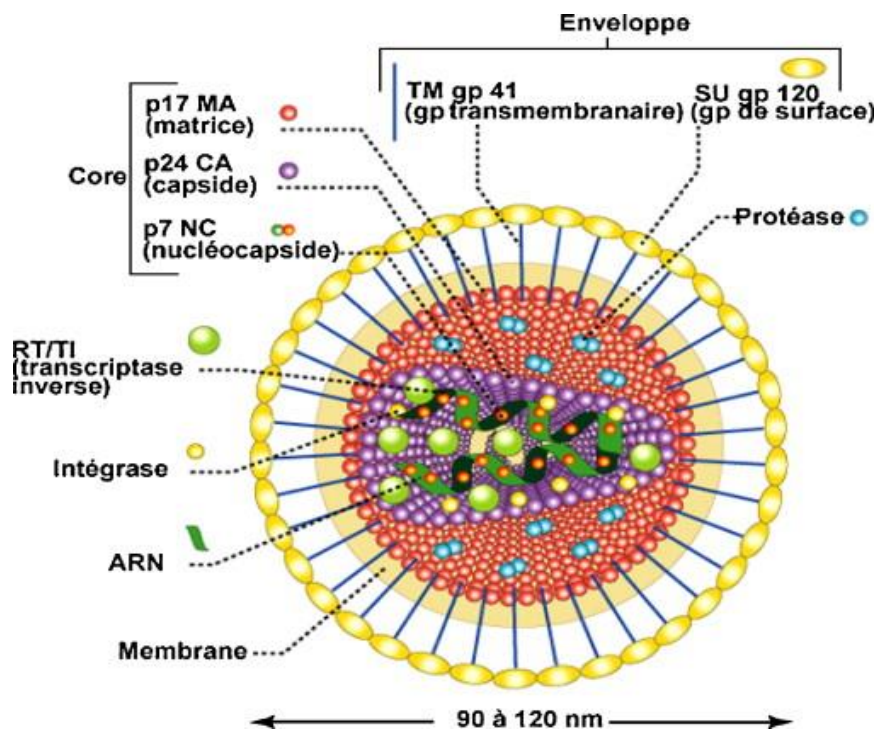


Figure 2: Structure du VIH (15)

III.4. Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est constitué de 9181 nucléotides et comporte trois gènes principaux appelés gag (« group specific antigen »), pol (« polymérase ») et env (« envelope»). Ils définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus.

Les précurseurs de la protéine Gag comprennent la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), un domaine p6, et 2 peptides SP1 et SP2.

Chaque domaine joue un rôle bien particulier.

La matrice qui est le domaine N-terminal du précurseur polyprotéique Pr55gag joue un rôle dans la reconnaissance de la membrane plasmique et dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans le virion.

La capside p24 est libérée de la polyprotéine Pr55gag par la protéase virale pendant la maturation, elle participe à l'assemblage de Gag et à la régulation de l'importation de l'ADN viral. Les interactions entre les oligomères de capside permettent la formation de la structure conique (16).

La nucléocapside (NC) une protéine de 55 acides aminés caractérisée par la présence de deux domaines à doigts de zinc CCHC (17). Ces domaines sont nécessaires à la réplication virale et participent directement à la reconnaissance du génome et à son encapsidation. NC est également impliquée dans la transcription inverse (18).

Le domaine p6 une protéine de 52 acides aminés est codée par la région la plus polymorphique du gène gag, est exclue de la capside et se trouve entre la matrice et la capside. Elle est décrite comme permettant l'incorporation de Vpr lors du bourgeonnement du virion (19).

Le précurseur Gag est clivé par la protéase pour obtenir la protéine Gag mature composée de MA, CA, NC et p6.

Le gène d'enveloppe (env) code pour 2 protéines : la gp 120 responsable de l'attachement du virus à la cellule cible, et la gp 41 nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, résultant de l'entrée du virus dans la cellule (20).

Le gène pol code quant à lui pour les enzymes essentielles au cycle viral telles que la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase (21).

La RT est active sous forme hétérodimérique composée de deux sous-unités, la p66 de 560 acides aminés et la p51 de 440 acides aminés. Elle comporte plusieurs activités enzymatiques : une activité ADN polymérase ADN ou ARN dépendante et une activité RNase H qui dégrade le brin d'ARN dans un hybride ARN-ADN. La RT nécessite la présence de cations divalents Mg²⁺ pour ses deux activités.

L'IN est une protéine de la famille des poly-nucléotidyl-transférase. Cette enzyme se compose de trois domaines et catalyse l'étape d'intégration virale.

La Protéase virale est une aspartate protéase qui est active sous sa forme dimérique. Chaque monomère est constitué de 99 acides aminés.

La Pr est nécessaire à la maturation des enzymes virales (transcriptase inverse/RNase H ou p51/p66, intégrase ou p34 et protéase elle-même ou (p11) et des protéines structurales de la

matrice (MA, p17), de la capsid (CA, p24) et de la nucléocapsid (NC, p7 et p6) constituant la capsid.

Six autres gènes, situés entre pol et env, codent pour des protéines régulatrices de l'expression des protéines virales qui sont Tat (Trans-Activator for viral Transcription), Rev (Regulator of Expression of Viral proteins), Vif (Viral infectivity Factor), Vpr (Viral protein R), Vpu (Viral protein U), et Nef (Negative Regulation Factor). Ces protéines auxiliaires sont essentielles à la réplication virale in vivo.

Tat est impliquée dans la régulation de la transcription des gènes via l'interaction avec une structure ARN de 59 nucléotides appelée TAR (transactivation-responsive region) (22,23). De plus, Tat peut être libérée par la cellule infectée et être internalisée par des cellules non infectées.

Rev est une protéine de 116 acides aminés contenant un domaine NLS (Nuclear localization signal) situé dans le domaine N-terminal de la protéine permettant son importation au noyau, le domaine C-terminal contient un signal d'export nucléaire. Rev en se fixant sur les ARNm viraux non ou mono-épissés au niveau de la séquence RRE (Rev response element) permet leurs transports vers le cytoplasme (24). Vif est une protéine de 23 kDa, elle induit la dégradation de la protéine APOBEC3G qui est un facteur cellulaire de restriction à l'infection virale (25), empêche ainsi la désamination de l'ADN viral.

Vpr est une protéine de 96 acides aminés. Cette protéine est décrite comme jouant un rôle important dans l'import nucléaire du CPI (Complexe de pré-intégration) dans les macrophages (26). Vpr est aussi impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Vpu est une protéine membranaire de 81 acides aminés, elle permet la neutralisation de facteurs cellulaires (diminution de l'expression des LT CD4+) améliorant ainsi la libération des virions.

Nef est une protéine de 27 à 35 kDa, elle est responsable de l'inhibition d'expression des protéines cellulaires : CD4, CD8, CD28, CMH-I et le CMH-II (27).

La transcription de ses gènes est régulée par l'activité du LTR (Long Terminal Repeat), où se trouvent les sites de liaison des facteurs de transcription.

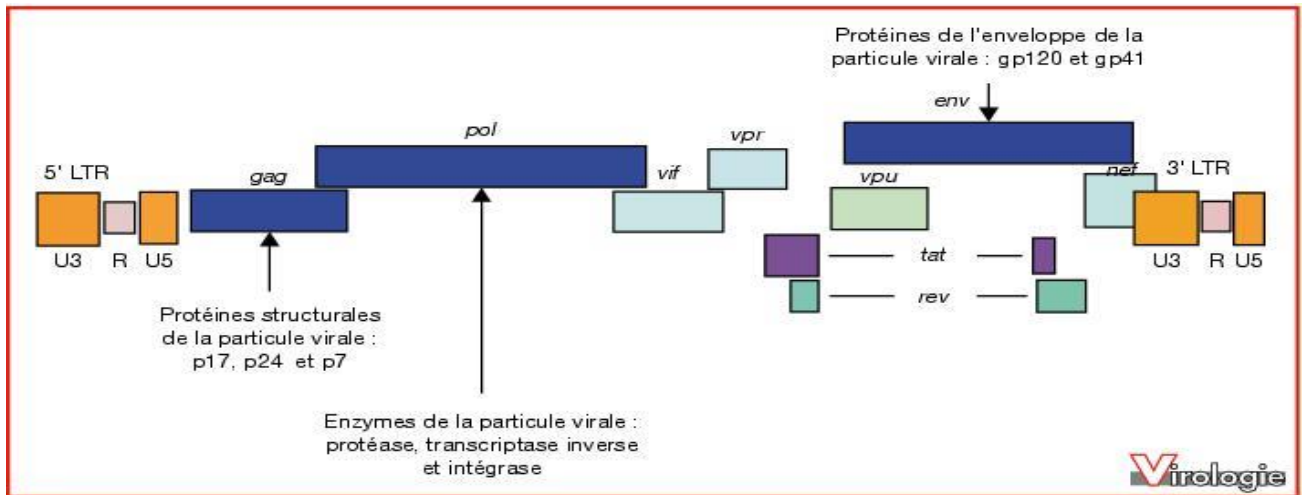


Figure 3: Structure de l'ADN proviral du VIH-1 (28)

III.5. Cycle répliatif du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 se divise en deux grandes phases : une phase précoce, et une phase tardive :

La phase précoce commence par l'attachement puis la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de l'hôte grâce à des récepteurs membranaires spécifiques (29,30). La protéine d'enveloppe virale gp120 se lie au récepteur primaire LT CD4 de la cellule hôte entraînant une modification conformationnelle de la gp120 alors capable de se fixer au corécepteur membranaire CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4) ou CCR5 (C-C chemokine receptor 5) (30,31).

Il s'ensuit un réarrangement de la protéine d'enveloppe virale gp41 qui permet la fusion des deux bicouches lipidiques virale et cellulaire et la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule (31). Ceci permet l'entrée du virus dans la cellule. L'ARN viral sera transformé en ADN proviral double brin par la rétro transcription dans le cytoplasme grâce à la transcriptase inverse, activité caractéristique des rétrovirus (32). Cette rétro-transcription est fréquemment responsable d'erreurs (1/10 000 copies de virus), car la TI est dépourvue d'activité exonucléase 3' vers 5' d'où la grande variabilité génétique du virus (33).

L'achèvement de la rétro transcription est concomitant à la décapsidation du virus et à la formation du complexe de pré-intégration nucléoprotéique appelé CPI. Ce complexe est ensuite activement transporté au noyau via le réseau micro-tubulaire afin de permettre son import dans le noyau via un transport actif par les pores nucléaires.

Le provirus est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte par l'intégrase virale (IN) ciblant majoritairement des régions transcrites du génome permettant la production de multiples virions.

La phase tardive du cycle fait référence à l'expression des gènes, ainsi qu'à l'assemblage, la maturation et la libération des nouveaux virions dépendant du type et de l'état d'activation de la cellule infectée (34). L'ADN proviral est transcrit en ARN messager et en ARN génomique 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.

Le clivage protéolytique des précurseurs notamment grâce à la protéase virale va permettre l'obtention des protéines matures impliquées dans l'assemblage et l'encapsidation de l'ARN viral, ainsi que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe.

Les nouvelles particules virales seront libérées par bourgeonnement à la surface de la cellule hôte avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire (35). La réplication virale est intense : 1 à 10 milliards de virions peuvent être produits chaque jour chez une personne non traitée.

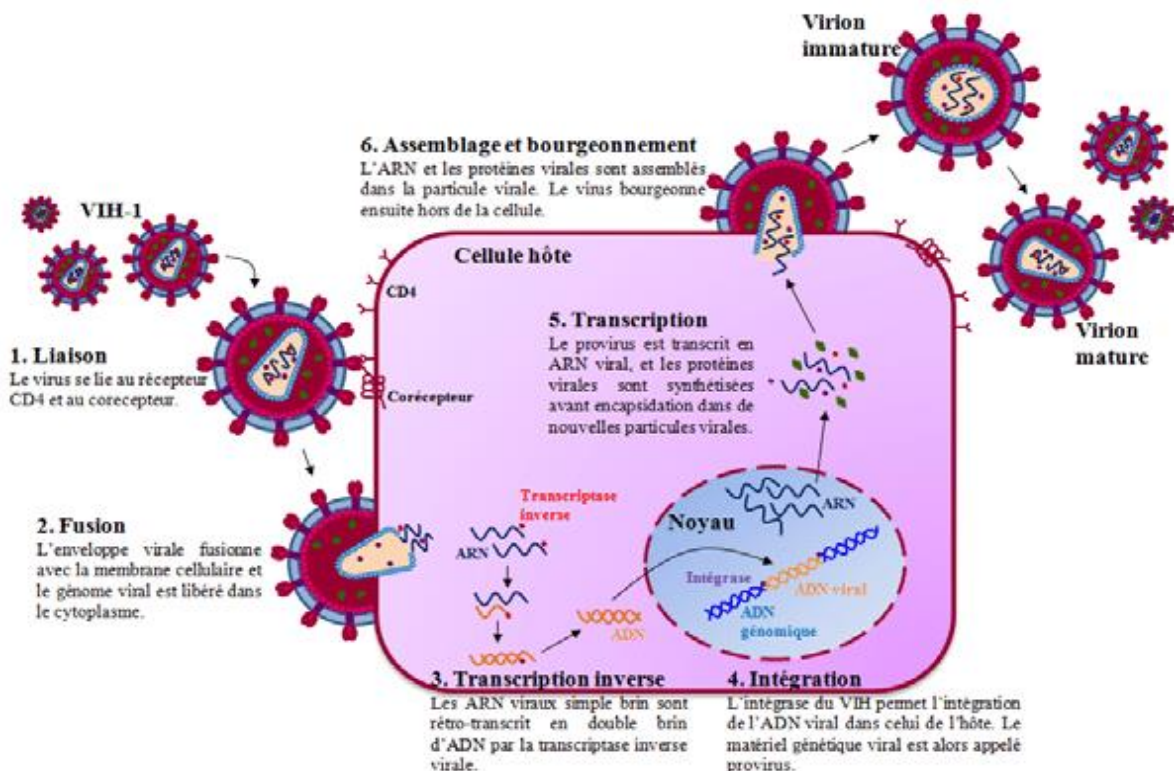


Figure 4 : Cycle réplcatif du VIH-1 (36).

III.6. Rôle de l'intégrase du VIH-1

L'intégrase du VIH est une protéine de 32kDa composée de 288 acides aminés codée par le gène pol et est issue de la maturation du précurseur Gag-Pol. Elle est constituée de trois domaines fonctionnels susceptibles d'être clivés par protéolyse (37) : le domaine N-terminal (résidus 1-50), le domaine central ou core catalytique (résidus 50-212) et le domaine C-terminal (résidus 212-288).

Le domaine N-terminal contient un motif conservé HHCC (His12, His16, Cys40, Cys43) qui permet la liaison du zinc impliqué dans l'oligomérisation de la protéine et dans la fixation de l'ADN viral (38,39).

Le domaine central comporte le site actif de l'enzyme composé par la triade catalytique D64D116D152 conservé dans la famille des poly-nucléotidyl-transférases à laquelle appartient l'IN (40,41). Le domaine central coordonne les deux ions divalents Mg^{2+} qui sont nécessaires pour l'activité catalytique de l'IN.

Le domaine C-terminal est le moins conservé des trois domaines de l'IN. Ce domaine possède des régions chargées positivement permettant une fixation à l'ADN de façon non spécifique. Il est également impliqué dans l'oligomérisation de l'IN (42).

L'intégration de l'ADN viral est une étape clé du cycle réplcatif viral et nécessite trois réactions consécutives : le 3'end processing, le transfert de brin et la réparation du site d'intégration.

La réaction d'intégration débute par un clivage des extrémités 3' U3 LTR et 3' U5 LTR de l'ADN viral. Chaque LTR possède à ces extrémités, un motif inversé répété hautement conservé, d'environ 20 pb, qui est reconnu spécifiquement par l'intégrase lors de cette première étape. L'activité de clivage va permettre de libérer des extrémités CA 3'OH rentrante marquant alors la jonction entre l'ADN viral et cellulaire du produit d'intégration (43).

Cette étape a lieu dans le cytoplasme de la cellule.

Après translocation du PIC dans le noyau, il y a catalyse de la seconde étape du processus d'intégration qui est l'insertion covalente des extrémités virales dans l'ADN cellulaire. Dans cette réaction, le groupement hydroxyle OH en 3' de l'adénosine attaque la liaison phosphodiester de l'ADN cible.

Cette réaction résulte en un clivage simultané des deux brins de l'ADN cible permettant la liaison de l'extrémité 3' de l'ADN viral à l'ADN cible au niveau du site de clivage par une réaction de substitution nucléophile.

L'attaque nucléophile s'effectue en deux sites localisés à chaque extrémité de l'ADN viral avec un décalage de cinq (05) paires de bases chez les lentivirus (43) ce qui entraîne la formation d'un trou (ou gap).

L'étape de réparation du site d'intégration consiste en l'élimination des deux dinucléotides des extrémités 5' de l'ADN viral, la ligation de ces extrémités avec les extrémités 3' de l'ADN chromosomique et le remplissage des gaps. L'ensemble de ces étapes est réalisé par des facteurs cellulaires tels que l'endonucléase FEN-1 ainsi que des ligases qui vont permettre de terminer le processus d'intégration (44).

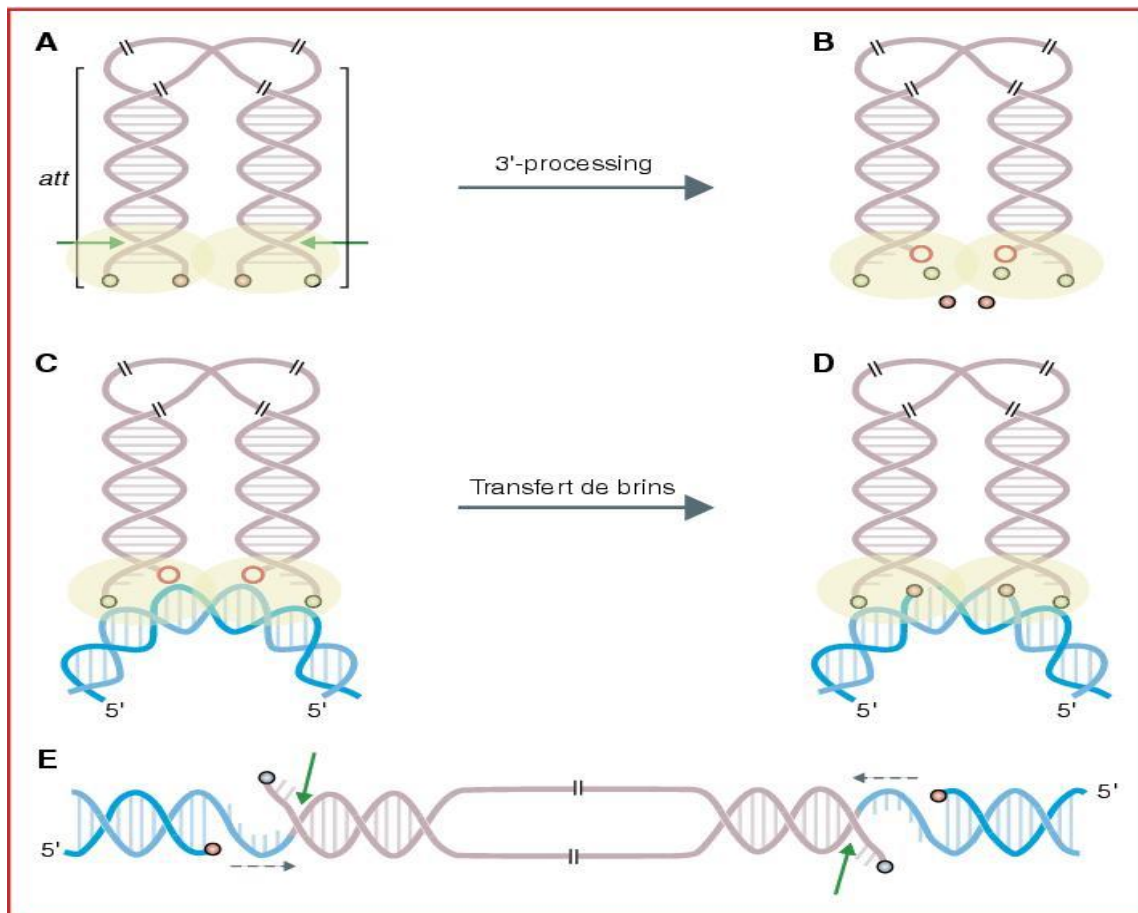


Figure 5 : Les différentes étapes de l'intégration (45)

III.7. Physiopathologie de l'infection à VIH-1

Les principales cibles du VIH-1 sont les cellules présentant à leur surface les récepteurs CD4. Ces cellules sont : les lymphocytes T CD4+, les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, ainsi que les cellules de la microglie cérébrale. Initialement cette réplication a lieu dans les organes lymphoïdes (tissus lymphoïdes, ganglions).

L'infection par VIH-1 évolue en plusieurs étapes se succédant dans le temps et conduisant à une destruction du système immunitaire de l'hôte. On distingue trois phases caractéristiques à l'infection du VIH-1 (46).

III.7.1. La primo-infection

Elle commence après la transmission du virus, et est caractérisée par une réplication active du virus dans l'organisme entraînant la destruction des lymphocytes T CD4+.

Les LT infectés se propagent dans la circulation sanguine, ce qui résulte d'une amplification virale secondaire massive au niveau du tractus digestif, de la rate et de la moelle osseuse. Cela correspond au pic virémique et se traduit par le début des symptômes cliniques (47).

La charge virale étant maximale alors que le patient n'ayant pas encore développé d'anticorps est toujours séronégatif. Cette étape est suivie par une réponse inflammatoire importante caractérisée par l'apparition d'anticorps anti-VIH-1 par stimulation des lymphocytes B et une réponse cytotoxique des lymphocytes CD8+ permettant de contenir l'infection.

Cette phase dure quelques semaines. Le risque de transmission est très important en raison de la virémie élevée ($10^6 - 10^7$ copies/ml de plasma).

III.7.2. La phase asymptomatique

La phase asymptomatique peut durer de quelques mois à plusieurs années, avec une faible réplication virale. Elle conduit à la sélection de variant échappant aux réponses immunes de l'hôte. Au cours de cette phase, la virémie diminue, et le taux de LT CD4+ est stabilisé avec la production de LT cytotoxiques CD8+ (CTL), et des anticorps spécifiques dirigés contre le VIH. Le système immunitaire contrôle l'infection jusqu'à épuisement des organes lymphoïdes centraux empêchant la régénération des LT CD4+.

III.7.3. La phase symptomatique ou phase SIDA

L'histoire naturelle de l'infection se termine par l'entrée en stade SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) du patient infecté.

Il y aura une nouvelle ascension de la virémie, et une chute des LT CD4+. Les infections opportunistes apparaissent dès la décroissance des LT CD4+ sous 200 cellules/mm³ conduisant sans traitement au décès du patient.

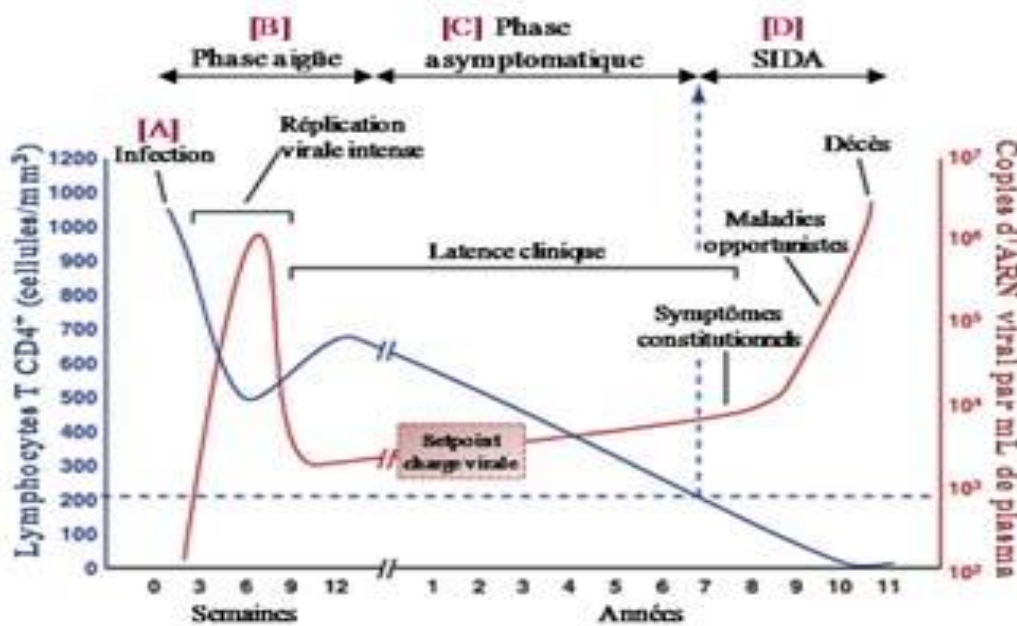


Figure 6: stades caractéristiques de l'infection à VIH-1 (48)

III.8. Mode de transmission du VIH-1

Il a été établi que la contamination par le VIH se faisait essentiellement par trois voies majoritaires.

- ✓ Par contact sexuel : se fait par contact entre les sécrétions sexuelles et les muqueuses génitales, voie de contamination la plus fréquente.
- ✓ Par voie verticale : In-utero (via une transmission trans-placentaire), Intra-partum (durant l'accouchement via un contact sanguin et les sécrétions vaginales), Post-partum (via l'allaitement maternel)
- ✓ Par voie sanguine : concerne les usagers de drogues injectables, les transfusés et les professionnels de santé.

Grâce à la mise en place du dépistage systématique des anticorps anti-VIH dès 1985 (49) les transmissions par transfusion ont été drastiquement diminuées et sont devenues très rares aujourd'hui.

La transmission dépend principalement de la charge virale dans le sang et les sécrétions génitales du sujet source.

III.9. Diversité génétique

Les virus de l'immunodéficience présentent une grande variabilité génomique due à différents mécanismes : la faible fiabilité de la TI, la TI dépourvue d'activité correctrice 3'-5' exonucléasique introduit une erreur tous les 104 nucléotides d'ARN copiés soit une mutation par cycle de réplication ;

Le taux extrêmement élevé de recombinaisons entre les brins d'ARN (jusqu'à 10 événement par cycle de réplication). En effet la TI au cours de la synthèse de l'ADNc a la capacité de passer d'une copie d'ARN à l'autre. La production virale étant estimée à un milliard de virions par jour alors des mutations vont s'accumuler. Ainsi nous retrouvons une population très diversifiée de variantes viraux, ou quasi-espèce favorisant l'émergence de souches résistantes chez une personne infectée. Cette variabilité génomique peut avoir des conséquences sur la réponse aux traitements antirétroviraux.

Ainsi le VIH est divisé en deux types principaux :

-Le VIH-1 le plus répandu présente une phylogénie beaucoup plus complexe, il est divisé en 4 groupes (50,51) dont le groupe majoritaire nommé M (Majeur), le groupe outlier nommé O, le groupe N (non M non O), et le groupe P de découverte relativement récente, en 2009 par l'équipe du professeur Plantier à Rouen chez une patiente d'origine Camerounaise.

L'origine de ce nouveau groupe P serait probablement lié à un passage du virus SIVGOR du gorille à l'homme, lors de la manipulation de viande de chimpanzés infectés (52).

La majorité des infections par le VIH-1 est causée par le groupe M, les infections par les groupes N et O étant restreints à l'Afrique centrale. Le groupe M, est divisés en 9 sous-types reconnus et désignés par les lettres A, B, C, D, F, G, H, J et K, les variations génétiques entre les sous-types allant de 25 à 35% selon les sous-types et les régions du génome considérés (53).

Il existe également des variations au sein d'un sous-type, entre 15 et 20%, tels que le sous-type F, divisé en F1 et F2 et le sous-type A en A1, A2 et A3. Les analyses de tout le génome ont révélé l'existence de virus recombinants inter sous-types, issus de patients surinfectés ou co-infectés (54).

Ces virus recombinants sont appelés CRFs (Circulating Recombinant Forms) lorsqu'ils ont été identifiés chez au moins 3 individus non liés épidémiologiquement et caractérisés sur tout le génome et URFs (Unique Recombinant Forms) dans le cas contraire.

Le sous-type B est retrouvé dès l'origine de l'épidémie aux États-Unis et en Europe. Les autres sous-types sont regroupés pour la pratique sous la dénomination de VIH-1 non-B et sont à l'origine de plus de 90% de la pandémie, notamment sur le continent Africain les principales variantes étant le sous-type C, qui prédomine en Afrique du Sud et de l'Est, suivi par le sous-type A et la forme recombinante CRF02_AG en Afrique de l'Ouest et du Centre-Ouest ; ils sont de plus en plus fréquemment responsables de nouvelles infections en Europe, particulièrement les formes recombinantes.

-Le VIH-2 type endémique, présente 50% d'homologie avec le VIH-1 au niveau des gènes gag et pol et apparaît comme moins infectieux à son tour est constitué de 2 groupes génétiquement différents désignés par les lettres A et B.

Actuellement 96 CRFs ont été identifiés pour le VIH-1, les formes recombinantes CRF01_AE et CRF02_AG jouant un rôle important dans les épidémies régionales. Le VIH-2 quant à lui connaît un seul CRF qui est le CRF01_AB.

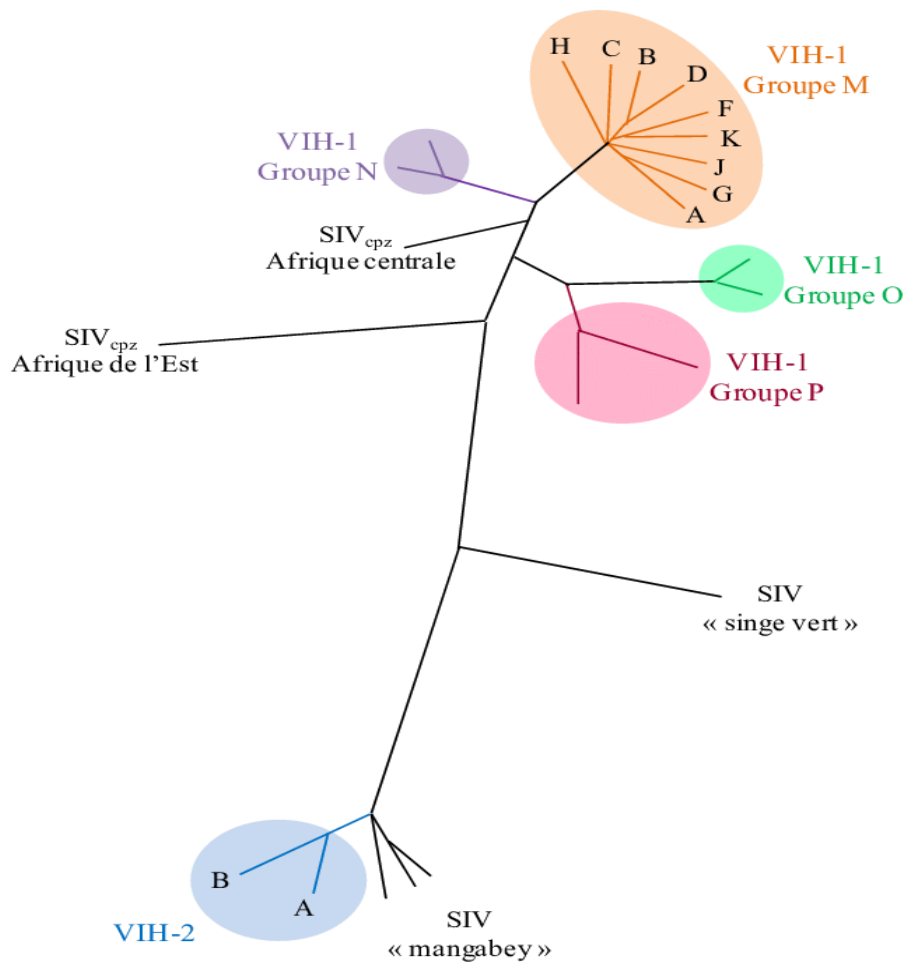


Figure 7 : Arbre phylogénétique des VIH (52)

III.10. EPIDEMIOLOGIE

Mélange complexe d'épidémies diverses à l'intérieur et entre les pays et les régions du monde, la pandémie du VIH-1 constitue sans aucun doute la crise de santé publique qui caractérise notre époque. Malgré l'ampleur d'une épidémie qui sévit depuis plus de 30 ans, on note une diminution du nombre de décès liés au sida grâce à un élargissement et à une intensification significatifs de l'accès au traitement antirétroviral au cours des dernières années.

En 2017 plus de la moitié des personnes porteuses du VIH soit 21,7 millions de personnes avaient désormais accès aux traitements antirétroviraux contre 17,1 millions en 2015 et 7,7 millions en 2010 (2).

On estime qu'en fin 2017 36,9 millions de personnes vivaient avec le VIH-1 dans le monde dont 1,8 million d'enfants, et 940 000 personnes sont décédées d'une ou des causes liées au VIH dans le monde. Entre 2000 et 2017, le nombre de nouvelles infections a chuté de 36% et celui des décès liés au VIH a baissé de 38% avec 11,4 millions de vies sauvées grâce au TAR sur la même période (2).

L'OMS estime qu'actuellement 75% seulement des personnes vivant avec le VIH connaissent leur situation ; et l'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec 25,7 millions des cas de VIH en 2017. Elle concentre également près des deux-tiers des nouvelles infections par ce virus survenant dans le monde. Représentant 69,64% des personnes vivant avec le VIH dans le monde (2). En Afrique subsaharienne, les nouvelles infections du VIH ont diminué de 48 % depuis 2000. 67 % des nouvelles infections du VIH parmi les jeunes gens touchent les jeunes femmes et les filles âgées de 15 à 24 ans.

Au Mali, les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2012 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographique et de Santé (EDS M-V) ont montré une baisse du taux de prévalence du sida de 1,3% à 1,1% faisant du Mali un pays à faible prévalence. En générale les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,3% et 0,8%). Le pic de séroprévalence se situe, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, dans la tranche d'âge 30-34 ans (2,2%), témoignage d'une épidémie bien installée (3).

REPARTITION GEOGRAPHIQUE

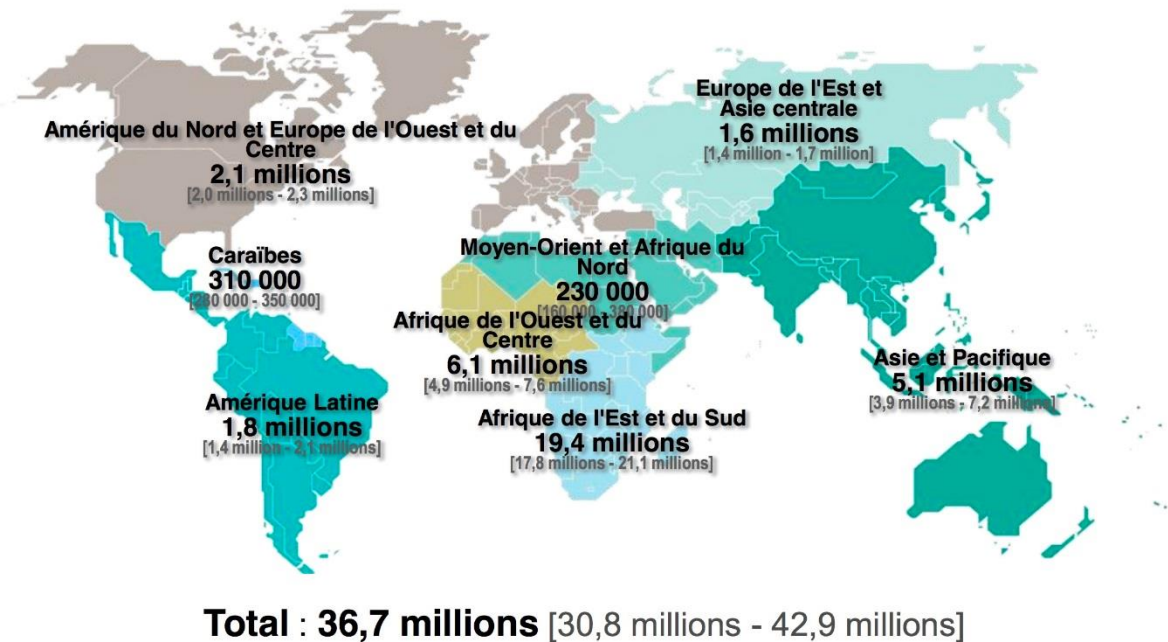


Figure 8: Répartition géographique des Personnes vivant avec le VIH dans le monde (55).

III.11. TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

L'objectif du traitement antirétroviral (ARV) est de diminuer et de maintenir une charge virale indétectable, afin de restaurer les défenses immunitaires, d'allonger l'espérance de vie, de diminuer le risque de comorbidités associées au VIH, et donc d'améliorer la qualité de vie des patients, et de réduire le risque de transmission.

Ce traitement repose sur l'utilisation d'inhibiteurs qui ciblent différentes étapes du cycle viral. Le premier traitement ARV disponible fut la monothérapie à base d'AZT (3'-azidothymidine) en 1985 (56). En 1996 arrive le concept de trithérapie, avec l'arrivée de nouvelles molécules ARV telles que les inhibiteurs de Protéase, montrant une réduction significative de la mortalité liée au SIDA.

La thérapie anti-VIH actuelle tourne autour d'une combinaison de molécules HAARTI (Highly Active Antiretroviral Therapy) dont la composition standard est aux moins (02) ou (03) inhibiteurs dirigés contre la RT auxquels peuvent s'ajouter un inhibiteur de la protéase ou de l'intégrase adaptés au génotype de résistance du virus. L'observance thérapeutique est primordiale pour une bonne activité du traitement. Ce traitement doit être maintenu à vie.

III.11.1. Les différentes classes thérapeutiques

Plus d'une vingtaine de molécules ARV sont disponibles de nos jours repartis en 6 classes thérapeutiques.

III.11.1.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

- Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques (INTI)

Les INTI Appelés aussi NRTI pour nucléoside reverse transcriptase inhibitor, ou en raccourci, NUC comme « nucléosidiques » correspondent à la première classe d'ARV développés. Ils sont actifs sur le VIH-1 et le VIH-2. Ce sont des analogues de bases nucléiques, des pro-médicaments qui doivent être phosphorylés dans le milieu intracellulaire pour être actifs. Ils pourront ensuite entrer en compétition avec les substrats naturels de la transcriptase inverse, afin d'inhiber l'action de cette dernière.

En résumé, ils bloquent la synthèse de l'ADN proviral (57). L'utilisation des premières molécules est restée limitée en raison des nombreux effets indésirables : La zidovudine (ZDV ou AZT) (analogue de la thymidine) associe une toxicité médullaire (neutropénies, anémies) et des myopathies. La Stavudine (d4T) analogue de la thymidine, et la didanosine (ddl) provoquent des neuropathies périphériques et des pancréatites. Dans certains cas, les effets indésirables peuvent être létaux soit par stéatose hépatique, soit par acidose lactique. Des rares cas de mitochondriopathies sévères ont été observés chez les enfants exposés aux antirétroviraux pendant la grossesse (58).

Les autres INTI sont l'Abacavir (ABC), le Ténofovir (TDF), la Lamivudine (3TC) (Analogue de la cytidine) et l'Emtricitabine (FTC). Ils présentent beaucoup moins d'effets indésirables.

Ces médicaments sont éliminés par voie rénale. Ils requièrent un dosage régulier pour adapter le traitement à la fonction rénale. Ils ne sont pas administrés en monothérapie.

III.11.1.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques ou non-nucléotidiques (INNTI)

La différence entre les INNTI et les INTI, c'est que les INNTI ne nécessitent pas de phosphorylation intracellulaire pour exercer leur action antivirale. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs de la transcriptase inverse. Ces inhibiteurs entraînent un changement conformationnelle qui perturbe le site catalytique de l'enzyme (59).

Leur pharmacocinétique est caractérisée par un métabolisme important du cytochrome p450. Ce sont des inducteurs enzymatiques avec une élimination rénale.

La sélection de mutants résistants est importante avec cette classe d'ARV, ils ne sont pas actifs sur le VIH-1 de groupe O et sur le VIH-2.

Parmi les effets secondaires, on peut noter des éruptions cutanéomuqueuses, des atteintes hépatiques et certains troubles neurologiques.

Les molécules de cette classe sont la Nevirapine (NVP), l'Efavirenz (EFV), l'Etravirine (ETR), la Rilpivirine (RPV) et la Doravirine.

III.11.1.3. Les inhibiteurs de la protéase (IP)

Les IP ont une action tardive sur le cycle de réplication du VIH-1. Les inhibiteurs se lient à la protéase pour occuper plus d'espace dans la poche catalytique que les substrats naturels entraînant ainsi une production de particules virales immatures et non infectieuses. Ils peuvent agir sur le VIH-1 ou le VIH-2 suivant le type de molécules. Métabolisés par le cytochrome P450, les IP font l'objet d'interactions avec d'autres médicaments utilisant les mêmes voies métaboliques nécessitant des ajustements de doses ou une contre-indication de certains de ces autres médicaments.

Ils sont à l'origine de la trithérapie (2 INTI et 1 IP) et ont permis de modifier considérablement le pronostic de la maladie. Les résistances aux IP s'observent principalement lors de l'arrêt et à la reprise d'un traitement.

Les principaux effets indésirables répertoriés sont des lithiases urinaires, des troubles digestifs, des éruptions cutanées. L'utilisation des IP est également associée, à des degrés divers à une redistribution des graisses, à des troubles de la glycorégulation et à des hyperlipidémies (60).

Les principales molécules sont : Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), Nelfinavir (NFV), Fosamprenavir (FPV), Lopinavir (LPV), Tipranavir (TPV), Atazanavir (ATV) et Darunavir (DRV).

Le Ritonavir (RTV) est souvent associé à une autre molécule anti-protéase. Il sert de booster.

III.11.1.4. Les Inhibiteurs de fusion

Les inhibiteurs de fusion bloquent la dernière étape du processus d'entrée virale en trois étapes consistant en la fixation, la liaison aux corécepteurs et la fusion, empêchant ainsi l'entrée de la capsid virale dans la cellule hôte.

La molécule de référence est l'Enfuvirtide, encore appelée T-20, c'est un peptide mimétique d'une région essentielle de la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp41 qui fonctionne en bloquant les réarrangements structuraux de la gp41 à une conformation de pré-fusion transitoire afin d'inhiber la fusion des bicouches lipidiques (61,62).

Le peptide Enfuvirtide (T20) est le seul inhibiteur de fusion virale utilisé en association pour l'infection par le VIH-1, mais il a une activité antivirale relativement faible et induit facilement une résistance aux médicaments. Des études récentes ont pu mettre au point un inhibiteur de lipopeptide à base de T20 qui manque de séquence de liaison de poche et cible un site différent. Ce nouveau lipopeptide, appelé LP-40, a été créé en remplaçant le TRM (tryptophane C-terminal) par un groupe d'acide gras. LP-40 a montré une affinité de liaison nettement améliorée pour le site cible et une activité inhibitrice considérablement accrue sur la fusion, l'entrée et l'infection de la membrane du VIH-1.

III.11.1.5. Les Inhibiteurs d'entrée

Les inhibiteurs d'entrée sont des molécules qui agissent de façon extracellulaire. Par conséquent ils n'ont pas besoin de traverser la membrane cellulaire et moins d'activation intracellulaire.

Ces inhibiteurs bloquent l'interaction entre la glycoprotéine virale gp120 et son corécepteur CCR5 ou CXCR4.

Parmi ces molécules nous trouvons le Maraviroc (MVC) antagoniste CCR5. Il inhibe de façon non compétitive le corécepteur CCR5 en se fixant sur la partie transmembranaire du corécepteur induisant ainsi une modification des domaines extracellulaires du corécepteur qui empêche la fixation de la gp120.

L'utilisation préalable de ces médicaments nécessite de connaître le tropisme du virus. Il ne sera possible de traiter que les patients ayant un virus avec un tropisme CCR5. En effet après la fixation du VIH sur le récepteur CD4+, des interactions ont lieu entre le virus et les corécepteurs protéiques, faisant partie de la famille des chimiokines, en particulier le CCR5 et le CXCR4 (63).

L'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre des corécepteurs définit le tropisme CCR5 (R5) ou CXCR4 (X4).

L'association de ces molécules aux autres ARV a permis d'améliorer la réponse antirétrovirale chez les patients en échec thérapeutique.

III.11.1.6. Les Inhibiteurs de l'intégrase

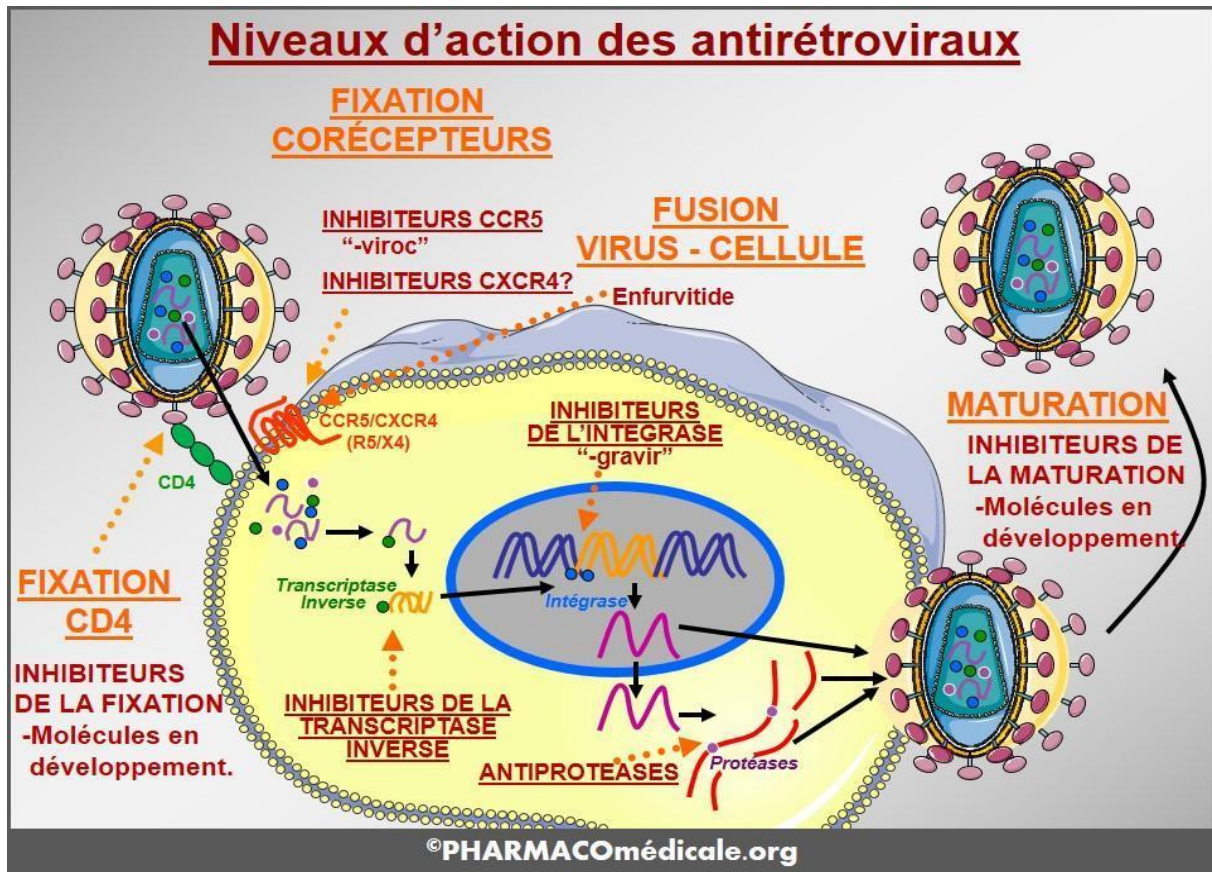
L'intégrase est une enzyme nécessaire à la catalyse de l'étape d'insertion et de transfert de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Cette étape d'intégration est fondamentale pour le maintien et la stabilité du génome viral, ainsi que pour une expression optimale des gènes viraux. Ainsi les inhibiteurs de l'intégrase empêchent l'insertion du matériel génétique du virus dans les cellules hôtes par inhibition de l'enzyme intégrase.

Depuis leur première approbation pour une utilisation clinique en 2007, les inhibiteurs de transfert de brin d'intégrase (INSTI) pour le traitement du VIH-1, ont démontré une supériorité remarquable par rapport aux autres classes de médicaments en termes de sécurité et de tolérabilité, de clairance virale rapide et de puissance élevée.

Trois médicaments ont été approuvés: le Raltégravir (RAL), l'Elvitégravir (EVG) et le Dolutégravir (DTG) avec le Cabotégravir (CAB) et le Bictégravir (BIC) en dernières étapes de l'évaluation clinique.

Le RAL, l'EVG et le DTG ont montré une efficacité à long terme, avec peu d'effets indésirables.

Les inhibiteurs de l'intégrase sont actifs sur les virus résistants aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), aux inhibiteurs de la protéase (IP) et aux inhibiteurs d'entrée.



III.11.2. Recommandation pour traiter

Les recommandations de l'OMS stipulent d'initier le TAR dès que possible à toute personne infectée par le VIH dont le diagnostic est confirmé, sans aucune restriction quant au nombre de LT CD4⁺ (65).

III.12. Schémas thérapeutique

Le schéma thérapeutique préconisée par l'OMS en première intention est l'utilisation de (02) INTI+ (01) INNTI ou (02) INTI+ (01) IP/r (/r = boosté par le Ritonavir) avec l'usage de molécules moins toxiques, bien toléré et disponible en combinaisons thérapeutiques de dose fixe, optimisant l'observance.

Au Mali, les régimes préférentiels en première intention ou schéma de 1^{ère} ligne et en deuxième intention ou de 2^{ème} ligne chez l'adulte et l'adolescent sont les suivants(4) :

Schémas de 1^{ère} ligne : associe (02) INTI + (01) INNTI, combinaison préférentielle pour la première ligne

Ténofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)

Les régimes alternatifs suivants sont possibles

- Zidovudine (ZDV, AZT) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP)
- Zidovudine (ZDV, AZT) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)
- Ténofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) ou Emtricitabine (FTC) + Nevirapine (NVP)
- Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV).

Schémas de 2^{ème} ligne :

Il est indiqué chez un patient en échec thérapeutique prouvé.

En cas d'échec pour cause d'inobservance, il faudra reprendre l'éducation thérapeutique du patient et renforcer l'observance avant d'envisager toute nouvelle ligne thérapeutique.

Le schéma de 2^{ème} ligne doit inclure au moins (02) nouvelles molécules dont l'une issue d'une famille différente des familles utilisées en première ligne. La Lamivudine (3TC) doit être toujours maintenue en 2^{ème} ligne car elle alourdit le virus qui se réplique moins.

Le schéma préférentiel de deuxième ligne recommandée est le suivant :

Deux (02) INTI + Un (01) IP boosté par le Ritonavir.

Les IP préférentiels sont : Lopinavir/r (LPV/r) et Atazanavir (ATV/r).

Schémas de 3^{ème} ligne

Les patients en échec virologique de 2^{ème} ligne doivent être gérés en fonction du résultat du test de génotype de résistance.

Suivi de la réponse au traitement et diagnostique d'un échec thérapeutique

La mesure de la charge virale est la méthode de suivi privilégiée pour faire le diagnostic de l'échec du TAR et pour confirmer ce type d'échec.

Si la mesure de la charge virale n'est pas disponible en routine, le diagnostic de l'échec thérapeutique doit être fait par un suivi du nombre de LT CD4⁺ et un suivi clinique.

III.13. ECHEC THERAPEUTIQUE

La documentation d'un échec thérapeutique est basée sur des critères cliniques, immunologiques et virologiques.

❖ **Echec clinique**

L'échec clinique se caractérise par la survenue de manifestations cliniques. Ces manifestations peuvent être des symptômes liés à l'infection par le VIH-1, une nouvelle infection opportuniste ou la rechute d'une infection préexistante causant une immunodépression sévère après 6 mois de traitement bien conduit.

❖ **Echec Immunologique**

L'échec immunologique se définit par un taux de lymphocytes T CD4⁺ ≤ 250 Cellules/mm³ suivant un échec clinique ou persistance d'une numération de LT CD4⁺ < 100 Cellules/mm³ malgré un traitement efficace depuis au moins 6 mois en l'absence de survenue d'une infection concomitante pouvant expliquer cette baisse.

Cette situation se rencontre le plus souvent chez les patients ayant initialement un taux de LT CD4⁺ pré-thérapeutique bas, un âge plus élevé. Cet échec peut s'accompagner d'un succès (charge virale indétectable) ou d'un échec virologique.

❖ **Echec Virologique**

L'échec virologique est la situation la plus fréquente, qui se caractérise par une réplication virale persistante malgré le traitement antirétroviral c'est-à-dire une charge virale juste au-dessus du seuil de détection des machines utilisées. Selon l'OMS l'échec virologique se définit comme une charge virale supérieure ou égale à 1000 copies sur la base de 2 mesures consécutives de la charges virales effectuées à 3 mois d'intervalle, avec un soutien à l'observance du traitement à l'issue du premier test virologique, après 6 mois de traitements bien conduit.

III.14. La résistance du VIH-1 aux antirétroviraux

L'efficacité du traitement ARV dépend de l'émergence de résistances aux différentes molécules antivirales.

Cette résistance est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de la gp41 ou de l'intégrase, lorsque la réplication virale persiste en présence d'antirétroviraux.

La sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations plasmatiques suboptimales d'antirétroviral consécutives à des difficultés d'observance ou à des interactions médicamenteuses), 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.

De ce fait les résistances peuvent s'acquérir au cours d'un traitement prolongé ou se transmettre *de novo* par une souche déjà mutée lors de la contamination.

✚ Résistance liée à la pharmacologie :

Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Deux mécanismes différents sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques :

- ✓ L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé est conférée par les mutations appelées TAM (thymidine analog mutations). Ces mutations favorisent l'accès de l'ATP au site de polymérisation qui réagit avec l'analogue nucléosidique en le détachant de la chaîne d'ADN viral en formation. Ce sont des mutations sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, zidovudine et Stavudine et comprennent : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Les TAM sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI, sauf à la Lamivudine, et cela à des niveaux divers. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAM et de l'INTI.
- ✓ La diminution d'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels est observée avec certaines mutations. Dans cette classe d'antirétroviraux la barrière génétique du VIH est variable selon les molécules et, en particulier, basse pour la Lamivudine (3TC) et l'Emtricitabine (FTC). La mutation M184V est sélectionnée par la 3TC et la FTC. Les mutations K65R/N/E sont sélectionnées par le Ténofovir disopropyl fumarate (TDF), l'Abacavir et la didanosine. La mutation L74V est sélectionnée par l'Abacavir et la didanosine.

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

Ces molécules bloquent la transcriptase inverse (TI) en se fixant au niveau d'une poche hydrophobique étroite et proche du site actif de l'enzyme. Une seule mutation à ce niveau peut entraîner une résistance de haut niveau à l'INNTI avec une résistance croisée entre l'Efavirenz, la Nevirapine et la Rilpivirine (K103N pour Efavirenz et Nevirapine, Y181C et E138K pour les trois). Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisqu'une seule mutation leur confère une résistance élevée.

Les inhibiteurs de protéase IP :

La résistance aux IP est liée à des mutations situées, d'une part, au niveau du site actif de l'enzyme et, d'autre part, à distance de celui-ci. Les mutations des sites actifs sont dites majeures (primaires) ; elles empêchent la fixation de l'IP au niveau du site actif.

Les autres mutations sont dites mineures (secondaires), elles augmentent le niveau de résistance et compensent la perte de capacité répliquative liée aux mutations primaires. Certaines de ces mutations primaires sont spécifiques d'un IP ; c'est le cas de la mutation I50L sélectionnée par l'Atazanavir chez des patients naïfs, qui, *in vitro*, n'entraîne pas de résistance croisée avec les autres IP. Peuvent être polymorphiques c'est-à-dire leur prévalence varie en fonction des sous-types de VIH.

Il existe d'autre possibilité de résistance aux IP induit par des mutations au niveau du gène gag (les sites de clivage). Ces mutations dans le gène *gag*, lorsqu'elles surviennent chez des virus porteurs de mutations dans le gène de la protéase, sont associées à une restauration partielle de la capacité répliquative de ces virus mutés.

Les inhibiteurs de fusion :

La résistance à l'Enfuvirtide, inhibiteur de fusion, est associée à des changements des acides aminés 36 à 45 du domaine HR-1 de la gp41.

Ces mutations suffisent parfois à engendrer un niveau élevé de résistance traduisant ainsi la faible barrière génétique du T20 et la nécessité de l'associer à d'autres molécules pleinement actives pour éviter un échec virologique rapide.

Les antagonistes du CCR5 :

En cas de tropisme R5, le mécanisme de résistance peut suivre 2 voies :

- ✓ Avec maintien du tropisme CCR5

La souche reste R5 mais s'adapte à la présence de l'antagoniste. Des mutations surviennent alors au niveau de la région V3 de la gp120.

- ✓ Avec changement de tropisme

La souche infectante devient R4 soit par évolution de la souche R5 initiale (switch), soit par émergence d'une population minoritaire X4 préexistante

Les inhibiteurs de l'intégrase :

Les inhibiteurs de l'intégrase (INI) agissent sur l'activité de transfert de brin dans le noyau.

La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection et à l'émergence, sous traitement, de variantes virales initialement minoritaires, portant des mutations de résistance. Cependant beaucoup de ces mutations sont considérées comme des polymorphismes.

Les voies de mutations primaires identifiées impliquent principalement des substitutions d'acides aminés à T66, E92 (Elvitégravir), Y143 (Raltégravir et Elvitégravir), Q148, N155 et R263 (Elvitégravir, Raltégravir et Dolutégravir) (66,67)

En plus de ceux-ci, certaines mutations polymorphiques jouent un rôle important dans le sauvetage viral fitness et / ou augmenter le niveau de résistance.

Des études biochimiques ont montré une influence dépendante du sous-type des polymorphismes naturels sur l'occurrence et l'activité de résistance d'un INI. Par exemple, les virus de sous-type B ont un coût de conditionnement physique plus élevé associé à G118R, une voie de résistance récemment proposée, comparée aux sous-types C et CRF_02_AG (68). Par conséquent, G118R a rarement été observé chez les virus de sous-type B. Cependant il a été montré que G118R pourrait être une voie alternative pour la résistance au dolutégravir chez les virus non-sous-types B, alors que R263K est la voie privilégiée pour le sous-type B. L'apparition de G118R est encore affectée par un rare polymorphisme naturel au codon 118 (GGG ou GGA) qui a une faible barrière génétique, facilitant la transition de la glycine en arginine (AGG ou AGA) par une seule mutation ponctuelle.

De ce fait la prévalence de la mutation G118R peut également différer par sous-type. De plus, l'impact d'autres mutations polymorphes dans l'augmentation de la résistance et le sauvetage de la forme virale des mutants G118R est également montré sous-type dépendant.

Pris ensemble, ces résultats indiquent que des différences mineures dans les polymorphismes entre les sous-types peut influencer l'émergence de variantes de virus résistant, renforcer la résistance ou même conduire au développement de nouvelles voies d'accès à la résistance.

Résistance liée au virus :

La diversité génétique du virus peut avoir des conséquences sur les voies génétiques utilisées par le virus pour acquérir une résistance aux antirétroviraux.

Le VIH-1 groupe O est naturellement résistant aux INNTI, en raison de la grande fréquence de la mutation 181C.

Le VIH-1 sous type non B présente un polymorphisme naturel sur le gène codant la protéase. Ainsi on observe des substitutions au niveau des codons impliqués dans la résistance aux antirétroviraux actifs sur le virus de sous type B.

De plus, de nombreuses études montrent que les substitutions correspondantes aux mutations mineures de résistance aux IP sont différentes selon les sous types non B du VIH-1 et différentes de celle du sous type B.

Le VIH-2 est naturellement résistant aux INNTI.

Facteurs de résistance liés aux personnes infectées :

L'observance du traitement antirétroviral est un facteur important pour la réussite du traitement chez une personne infectée. Lorsqu'elle est insuffisante, cela constitue un facteur prédictif de l'échec virologique, de l'émergence d'une résistance du VIH aux ARV, de la progression de la maladie et du décès.

D'autres facteurs ont été associés à une mauvaise observance. Il s'agit de la dépression non-traitée, la toxicomanie, l'ignorance de la maladie et de l'importance de la prise du traitement, de la quantité de comprimés à prendre. Il est donc crucial que les ARV soient disponibles continuellement et que l'observance soit soigneusement contrôlée chez les patients infectés pour favoriser leur meilleure prise en charge et par conséquent leur bien-être.

III.15. Méthodes d'identification des mutations de résistances aux ARV :

Il existe 2 types de tests pour évaluer les résistances aux ARV: les tests phénotypiques, et les tests génotypiques.

A. Tests phénotypiques :

Les tests phénotypiques mesurent *in vitro* (en culture cellulaire) les concentrations de la drogue inhibant 50% ou 90% de la réplication virale (CI50, et CI90). Ces tests utilisent des virus recombinants, incluant la protéase et/ou la transcriptase inverse du patient.

Ce sont des techniques qui nécessitent des structures automatisées, très coûteux. En pratique clinique, ils n'ont pas d'avantage sur le génotype ; ils sont plus utilisés pour le développement de nouvelle drogue et dans le cadre de protocoles de recherche.

B. Tests génotypiques :

Les tests génotypiques reposent sur une amplification et un séquençage des gènes d'intérêt du VIH-1 la transcriptase inverse, la protéase, l'intégrase, la boucle V3 ou la gp41 et la gp120 par RT-PCR. Il existe des tests commercialisés et de nombreux protocoles « maisons » basés sur les recommandations de l'Agence Nationale de Recherche contre le Sida (ANRS).

Ces tests ont des coûts relativement modéré ; ils nécessitent un algorithme d'interprétation.

Les différents algorithmes utilisés sont :

- Groupe ANRS AC11 Résistance : hivfrenchresistance.org
- Stanford HIV Data base, Rega Institute
- Virtual Phenotype

Dans un cas comme dans l'autre, la réalisation et l'interprétation du test nécessite une CV ≥ 1000 copies/ml dans le plasma. Ces tests ne détectent que les mutations majoritaires ($> 20-30\%$ des variantes).



METHODOLOGIE

IV. METHODOLOGIE

IV.1. Cadre et lieu d'étude

Cette étude s'est déroulée au centre de recherche et de formation sur le VIH/SIDA et la tuberculose « SEREFO ». Situé dans l'enceinte de la Faculté de Médecine, d'Odonto Stomatologie (FMOS) et la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali, SEREFO est un centre de recherche issue de la collaboration entre la FMOS-FAPH et les Instituts Nationaux de la santé des Etats-Unis d'Amérique (NIH-NIAID) pour une meilleure formation des chercheurs et la recherche sur le VIH et la tuberculose.

Infrastructures et équipements

Le SEREFO est doté d'un volet laboratoire composé de 3 principaux laboratoires et d'un volet clinique s'appuyant sur les services de pneumologie et de maladies infectieuses du centre hospitalier universitaire du Point « G ».

Volet laboratoire

🚦 Le laboratoire d'Immunologie

Ce laboratoire dispose des équipements modernes pour mesurer les taux de CD4, et les paramètres hématologiques.

En plus de ceux-ci, les cytophotomètres de flux sophistiqués permettent d'initier des tests immunologiques complexes.

Le laboratoire d'Immunologie est un laboratoire de dernière génération qui soutient des études complexes visant à mieux comprendre le système immunitaire de l'homme et la pathogénie de la maladie.

🚦 Le Laboratoire de Tuberculose

L'activité de ce laboratoire est axée sur l'isolement, l'identification et la description des variantes de souches de mycobactéries, l'étude de la réponse immunitaire des patients infectés par le VIH et la tuberculose. Il dispose également d'un espace de haute sécurité nommé BSL-3 (BioSafety level-3) ou laboratoire de niveau P3, dans lequel est pratiqué principalement la culture des mycobactéries. En 2006, le BSL3 a reçu la certification de l'OMS, représentant le premier laboratoire BSL3 certifié au Mali.

En plus du BSL3, nous disposons d'un laboratoire de biologie moléculaire doté de plusieurs appareils de PCR permettant de faire le génotypage des mycobactéries grâce au Spolygotypage.

Le Laboratoire d'épidémiologie moléculaire et de résistance du VIH

La charge virale et le test génotypique de résistance du VIH aux ARV sont effectués par l'unité d'épidémiologie moléculaire et de résistance du VIH aux ARV.

Ce laboratoire est divisé en deux :

Une partie se trouve au sein du SEREFO, réservée pour le séquençage ;

Un autre laboratoire réservé pour la charge virale se trouve dans un autre bâtiment au sein de la cours de la Faculté. Ce laboratoire est subdivisé en trois zones (salle1, 2 et 3) :

- ✓ Salle 1 dédiée aux procédures d'extraction des acides nucléiques et à l'ajout des acides nucléiques purifiés au master mix (préparé dans la salle 2).
- ✓ Salle 2 réservé pour la phase d'activation et d'amplification du VIH-1.
- ✓ Salle 3 réservé à l'appareil (ABBOOT m2000) pour la quantification du virus.

Volet clinique

Il s'occupe du recrutement et du suivi des patients sur le plan clinique au niveau d'espaces aménagés dans les hôpitaux, au CESAC (Centre d'Ecoute de Soins d'Animation et de Conseil) et dans les centres de référence des communes du district de Bamako.

Le recrutement de nos patients a été effectué au niveau du CESAC. Ce centre a été créé en 1996 dans l'optique de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH. Géré par ARCAD-SIDA, il est actuellement une référence en matière de lutte contre le VIH-SIDA.

IV.2. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude descriptive rétrospective incluant des patients infectés par le VIH-1 et naïfs de traitement antirétroviral entre Juin et Novembre 2013.

IV.3. Echantillon

a) Population d'étude

L'étude a concerné 150 échantillons séquencés de patients séropositifs naïfs de tout traitement ARV parmi lesquelles 77 séquences de VIH-1 venaient de patient du CESAC du Mali et 73 séquences de VIH-1 venaient de patient de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière de Paris.

b) Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans notre étude les patients :

- Infectés par le VIH-1 ;
- Nouvellement diagnostiqués et naïfs de tout traitement ARV ;
- Consentant à participer à l'étude.

c) Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus dans notre étude les patients :

- Infectés par le VIH-2 ;
- Co-infectés par le VIH-1 et VIH-2 ;
- N'ayant pas consenti à participer à l'étude.

IV.4. Méthode utilisée

La technique de l'ANRS

Il s'agissait d'une technique maison préparant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, à la PCR nichée et à la réaction de séquence.

Deux protocoles ont été utilisés pour la réalisation cette technique :

Protocole 1

Procédures d'Extraction de l'ARN

1. Préparation des réactifs

a) Le mélange d'ARN carrier-tampon AVE au tampon AVL

Ajouter 310 µl de tampon AVE au tube contenant 310 µg d'ARN carrier lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl. Dissoudre complètement l'ARN carrier, le diviser en aliquotes et le stocker à -20°C. Ne pas congeler et décongeler les aliquotes d'ARN carrier-tampon AVE plus de trois fois.

Incuber le tampon AVL à 80°C pour dissoudre les cristaux s'il y en a éventuellement.

Calculer le volume de tampon AVL et le volume d'ARN carrier-tampon AVE requise en fonction du nombre d'échantillons à traiter avec les formules suivantes :

$n \times 0,56 \text{ mL} = y \text{ mL}$ $y \text{ mL} \times 10 \text{ µL/mL} = z \text{ µL}$

n = nombre d'échantillons à traiter ;

Y (ml) = volume de tampon AVL à utiliser ;

Z (μ l) = volume d'ARN carrier-tampon AVE à ajouter au tampon AVL

b) Reconstitution du tampon AW1

Ajouter 125 ml d'éthanol (96-100%) à 95 ml d'aw1 concentré pour un volume final de 220 ml. Le mélange est stable pendant une année à température ambiante ou jusqu'à la date d'expiration du kit.

c) Reconstitution du tampon AW2

Ajouter 160 ml d'éthanol (96-100%) à 66 ml d'aw2 concentré pour un volume final de 226 ml. Le mélange est stable pendant une année à température ambiante ou jusqu'à la date d'expiration du kit.

2. Concentration de L'ARN

- Sortir tous les réactifs et les laisser 1 heure à la température du laboratoire pour décongélation ;
- Mettre la centrifugeuse en marche et la régler à 5°C pendant 20mn avant la centrifugation ;
- Mettre 1000 μ l (1mL) de plasma dans un tube eppendorf à fond conique de 1,5 ml bien identifié ;
- Centrifuger à 14000tr/mn pendant 1heure à 4°C.

3. Procédure d'extraction de l'ARN

- Conserver 140 μ L de culot (rejeter 860 μ L de surnageant) dans le tube de 1,5 ml pour le VIH-1.
- Ajouter 560 μ L de tampon AVL-RNA carrier-tampon AVE et mélanger par impulsion-vortex 15 secondes;
- Incuber à la température du laboratoire (15-25°C) pendant 10 minutes pour assurer la lyse complète des particules virales;
- Faire une brève centrifugation (8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C) pour enlever des gouttes à l'intérieur du couvercle;

- Ajouter 560 µL d'éthanol (96-100%) au lysat et mélanger par impulsion-vortex 15 secondes pour précipiter l'acide nucléique (ARN rétroviral). Après mélange, faire une brève centrifugation (8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C) pour enlever des gouttes à l'intérieur du couvercle ;
- Bien identifier la colonne à filtre et la mettre dans un tube collecteur. Mettre 630 µl du précipité directement sur le filtre (sans toucher le filtre) et centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour permettre la capture de l'ARN rétroviral sur les filtres ;
- Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter le reste du précipité directement sur le filtre de la colonne à filtre (sans toucher le filtre) et centrifuger à nouveau à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour optimiser la capture de l'ARN rétroviral sur les filtres ;
- Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter 500 µl d'AW1 (mélangé par impulsion-vortex 15 secondes). Centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour le 1^{er} lavage ;
- Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter 500 µl d'AW2 (mélangé par impulsion-vortex 15 secondes). Centrifuger à 14000 tours/minute pendant 3 minutes à 20°C pour le 2^{ème} lavage ;
- Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et centrifuger à vide à 14000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour éliminer les traces de tampon AW2;
- Transférer la colonne à filtre sur un tube eppendorf stérile de 1,5 ml bien identifié et ajouter 60 µl de tampon AVE puis incuber 1 minute à la température ambiante ;
- Centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C ;
- Jeter la colonne à filtre et boucher le tube stérile contenant les ARNs élués. conserver l'éluât à -80°C.

PROTOCOLE 2:

Concerne l'amplification de l'ARN extrait

1. RECONSTITUTION DES OLIGONUCLEOTIDES (AMORCES)

Les amorces sont fournies dans des tubes sous forme lyophilisée.

- ✓ Faire des aliquotes à 100 µm en se servant de la fiche technique des oligonucléotides pour connaître le volume d'eau à ajouter.

- ✓ Faire ensuite des aliquotes de 6 µl de la solution à 100 µm qui serviront ultérieurement pour les PCR

2. AMPLIFICATION PAR PCR

A. RT/PCR :

Les amorces externes sont utilisées :

Tableau I : Les différentes amorces utilisées pour la RT-PCR et la PCR nichée

Gène	Couple d'Amorce	Sens	Nom de l'Amorce
Intégrase	Externe	Sens	INPS1
		Anti-sens	INPR8
	Interne	Sens	INPS2
		Anti-sens	INPR9

10µL d'ARN précédemment extrait sont ajoutés au mix réactionnel constitué comme suit :

Tableau II : Composition du mix réactionnel pour un échantillon pour la RT-PCR

RNase free water	24,30 µl
5XQiagen OneStep RT-PCR buffer	10,00 µl
dNTP mix (10mm de chaque dNTP)	2,00 µl
Amorce sens (50pmol/µL)	0,60 µl
Amorce anti-sens (50pmol/µl)	0,60 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	2,00 µl
RNase inhibitor APPLIED 20 u/µl	0,50 µl
Volume final	40 µl

Le Thermocycleur est programmé comme suite:

Tableau III : Programme du thermocycleur pour la RT-PCR

Processus	Températures	Temps	Nombre de cycle
Transcription inverse	50°C	30 min	1 cycle
Activation initiale	95°C	15 min	1 cycle
Dénaturation	94°C	30sec	40 cycles
Hybridation	55°C	30sec	
Elongation	72°C	1 min 30sec	
Elongation Finale	72°C	10 min	1

B. Nested PCR ou PCR nichée :

Cette deuxième PCR est réalisée à partir des amplicons précédemment obtenus. Elle a pour but d'amplifier la matrice.

Les amorces internes sont utilisées.

9µl de produit de RT-PCR sont ajoutés au 41µl de mix réactionnel utilisant le « Hot Start PCR master mix » (Biotech Rabbit) complété des amorces.

Tableau IV : Composition du mix réactionnel pour un échantillon pour la PCR nichée

RNase free water	15 µl
Amorce sens (50pmol/µl)	0,50 µl
Amorce anti-sens (50pmol/µl)	0,50 µl
Enzyme Hot Start PCR master mix	25 µl
Volume Final	41 µl

Le programme du thermocycleur est indiqué ci-dessous :

Tableau V : Programme du thermocycleur pour la PCR nichée

Processus	Températures	Temps	Nombre de Cycles
Activation initiale	94°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	30sec	
Hybridation	55°C	45sec	40
Extension	72°C	1 min 30sec	
Extension Finale	72°C	5 min	1

3. Dépôt et migration des produits de la Nested PCR sur gel d'agarose :

- a) **Préparation du gel d'agarose** : mélanger 150 ml de tampon TBE (pH 8,3) à 1,5 g d'agarose pure et porter le mélange à ébullition dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes pour faire fondre l'agarose. Laisser un peu refroidir dans un bain marin et ajouter 5µl de BET (Bromure d'Ethidium). Couler le gel et laisser refroidir pendant 20-30 min.
- b) **Dépôt et migration des produits** : Après solidification du gel, celui-ci est placé dans une cuve de migration contenant du tampon de migration TBE 0,5x. Dans chacun des puits, est déposé 18µL de mix contenant le produit d'amplification ou un témoin de bas poids moléculaire (Smart Ladder) associé à un marqueur coloré (6x Orange) permettant le maintien de l'ADN dans le puits.

Tableau VI : Préparation du mix pour la migration sur gel

6 x orange DNA	3 µL
Produit de PCR ou Smart Ladder	5 µL
Eau	10 µL

Après une migration d'environ 45 minutes à 90 volts, le gel est analysé sous UV et photographié

4. PURIFICATION DE L'ADN AVEC LE KIT QIAGEN

- Identifier la colonne munie de filtre
- Mettre 250 µl de tampon BP sur le filtre sans le toucher
- Ajouter le reste des amplicons positifs après l'électrophorèse en gel d'agarose et homogénéiser avec la pipette
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute

- Enlever la colonne et verser le filtrat
- Placer à nouveau la colonne sur le tube collecteur et ajouter 750 µl de solution de lavage
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Enlever la colonne et verser le filtrat
- Placer à nouveau la colonne sur le tube collecteur et centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Identifier une série de tubes de 2 ml en vue de recueillir l'éluât
- Remplacer les tubes collecteurs par les nouveaux tubes de 2 ml identifiés
- Ajouter 60 µl d'eau ppi sur le filtre puis laisser incuber 5 mn
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Jeter les colonnes et conserver le gène purifié à -20°C.

5. LA REACTION DE SEQUENCE

- Préparer autant de mix que d'amorces et prévoir 2 échantillons supplémentaires dans le calcul des quantités de réactif à prendre pour préparer les mix
- Homogénéiser juste avant de distribuer
- Mettre la quantité de mix indiquée (11µl) dans les micro-tubes de la plaque de séquençage selon la feuille de paillasse
- Ajouter la quantité d'ADN purifiée (1µl) et fermer la plaque avec du papier autocollant.

Le mix réactionnel est fonction de la quantité estimée d'ADN amplifié. La quantité d'ADN peut varier de 1 à 5µL nécessitant d'adapter la quantité d'eau de 9 à 13µL.

Les amorces utilisées sont les mêmes que pour la PCR nichée.

Tableau VII : Mix réactionnel BigDye Terminator pour un échantillon pour la réaction de séquence.

	Volume en μL
Mix cycle sequencing big dye	4 μl
Tampon Buffer	2 μl
Amorce (3,2pmol/ μl)	1 μl
H2O	9 μl
DNA	5 μl
Volume Final	21 μl

Tableau VIII : Programme du thermocycleur pour la réaction de séquence

Processus	Temperatures	Temps	Cycles
Activation initiale	96°C	1 min	1 cycle
Denaturation	96°C	10 sec	
Hybridation	50°C	5 sec	25 Cycles
Extension	60°C	4 min	
Extension Finale	4°C	-	-

6. PRECIPITATION ETHANOLIQUE

- Enlever la plaque du thermocycleur
- Ajouter 16 μl d'eau ppi
- Puis 64 μl d'éthanol 95-100%
- Bien homogénéiser avec une micropipette
- Fermer la plaque avec du papier autocollant
- Incuber à la température du laboratoire pendant 40 minutes à l'abri de la lumière (peut être conservée toute la nuit)
- Centrifuger à 2700 g (rcf) pendant 30 minutes
- Renverser délicatement la plaque sur du papier buvard et tapoter légèrement
- Ajouter 150 μl d'éthanol à 70%
- Fermer la plaque avec du papier autocollant
- Centrifuger à 2000 g (rcf) pendant 10 minutes
- Renverser délicatement la plaque sur du papier buvard

- Emballer la plaque dans du papier buvard, puis avec du papier aluminium.
- Centrifuger à 700 g pendant 1 minute pour enlever toute trace de liquide
- Ajouter 20 µl de formamide dans chaque micro-tube (utiliser les bacs de distribution et la pipette multicanaux)
- Tapoter légèrement pour faire descendre toute la solution de formamide
- Fermer avec un septum
- Agiter vigoureusement
- Conserver la plaque au réfrigérateur

7. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

Le séquençage a été réalisé sur l'automate ABI 3130 (applied biosystems, Courtabœuf, France), et l'analyse des séquences a été faite grâce au logiciel Sequencing analysis.

8. Alignement des séquences

L'alignement des séquences a été effectué à l'aide du logiciel Seq cape v2.7. Ce logiciel permet de les comparer par rapport à une souche de référence (HXB2), afin de repérer les éventuelles mutations responsables de résistance aux antirétroviraux.

IV.5. Interprétation des résultats

Les séquences obtenues en nucléotides sont transcrites en acides aminés, et sont comparées à une séquence de référence d'origine B, et multi-sensible.

Il est nécessaire d'avoir un algorithme d'interprétation.

Les différences observées entre les deux séquences seront répertoriées dans une liste et dénommées par une appellation universelle : la première lettre code pour l'acide aminé (AA) de la séquence d'origine, suivi de sa position. La deuxième lettre code pour l'AA de la séquence étudiée. Par exemple L74M : la leucine en position 74 est remplacée par la méthionine.

Les mutations sont ensuite répertoriées dans un logiciel qui les analyse et qui donne les différentes résistances aux antirétroviraux.

Cette interprétation peut se faire avec l'algorithme d'interprétation des Français (ANRS) ou avec celui des Américains (STANFORD HIVdb). Ces algorithmes sont régulièrement mis à jours. Nous avons utilisés trois algorithmes d'interprétation à savoir l'algorithme de l'ANRS, STANFORD et REGA.

IV.6. ANALYSE DES DONNEES

Les données ont été saisies sur Excel Et analysées sur Epi info7

La variable étudiée était le 3 MutationS.

IV.7. ASPECT ETHIQUE

Nous avons respecté les règles éthiques De confidentialité, les noms et prénoms Des patients n'ont pas été divulgués.



RESULTATS

V. RESULTATS

Sous-typAge VIH-1

NoUs avons analysé avec trois algoRithmes diffÉrents

150 séquences de l'enzyme intégrase Du VIH-1, provenant d'individus VIH-1 positifs naïfs de tout traitement ARV. Parmi les 150 séquences 77 provenaient du Mali et 73 provenaient de Paris.

En utilisant l'algorithme de l'ANRS 48,67% des patients (73/150) étaient infectés par le VIH-1 forme recombinate CRF02_AG suivis de 48% (72/150) du sous-type B, 2,0 % (3/150) de sous-type A1, 0,67% (1/150) de sous-type C et 0,67% (1/150) de sous-type D.

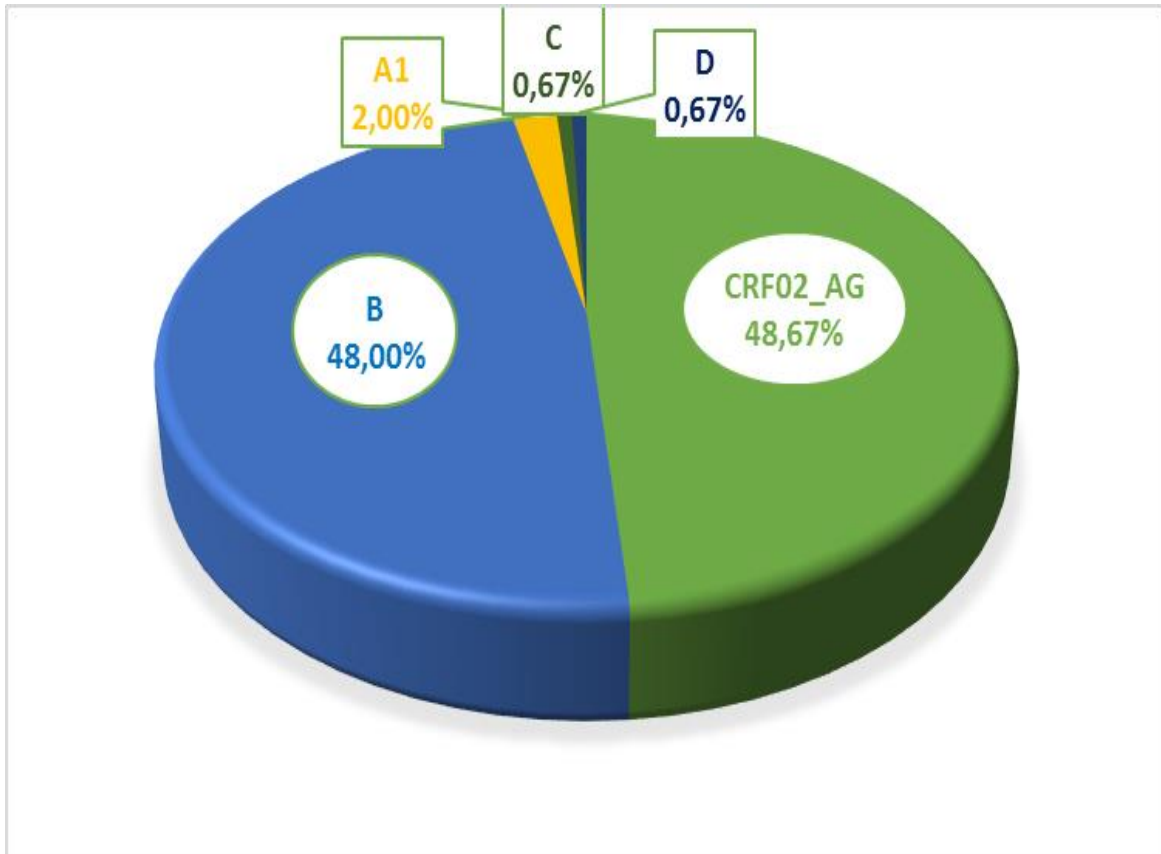


Figure 10 : Prévalence des différents sous types de VIH-1 identifiés par l'algorithme de l'ANRS.

Analyse des mutations de résistance

Les analyses de pharmaco-résistance ont montré qu'aucune mutation de résistance majeure aux INI n'était présente dans cette étude. Cependant, des mutations accessoires polymorphes ou non ont été identifiées selon les sous-types VIH-1 identifiés.

Les polymorphismes naturels T124A et T206S étaient les plus majoritaires avec respectivement 61,33% (92/150) et 56,67% (85/150). Ces polymorphismes naturels étaient plus majoritaires chez les sous-types recombinants CRF02_AG 44,67% et 48% que chez le sous-type B 14% et 7,33% avec un $P < 0,01$ chacune.

T124A a été également identifiée chez 3 sous-types A1 et le sous-type D ; T206S a été identifié également chez un sous-type A1 et chez le sous-type D.

Tableau IX: Prévalence des deux polymorphismes T124A et T206S en fonction des différents sous-types VIH-1 identifiés.

Mutations/ Sous-types	T124A	T206S
CRF 2_AG	67 (44,67)	72 (48%)
A1	3 (2%)	1 (0,67%)
B	21 (14%)	11 (7,33%)
C		
D	(0,67%)	1 (0,67%)
Total	92 (61,33%)	85 (56,67%)
P value	< 0,01	< 0,01

D'autres mutations mineures polymorphes ont été identifiées parmi lesquelles S19P était majoritairement présente à 10,66% (16/150 patients), suivis de S230N 4,66% (7/150).

Evaluation de la résistance primaire du VIH-1 aux inhibiteurs d'Intégrase

patients) ; K156N 4% (6/150), S119T 4% (6/150), L74M 3,33% (5/150), E157Q 3,33% (5/150), S119G 2% (3/150), G13E 2% (3/150), D232E 2% (3/150) ; T97A 1,33% (2/150), G16Q 1,33% (2/150), V260I 1,33% (2/150), V165I 1,33% (2/150), V151I 0,66% (1/150), G163N 0,66% (1/150), A49P 0,66% (1/150).

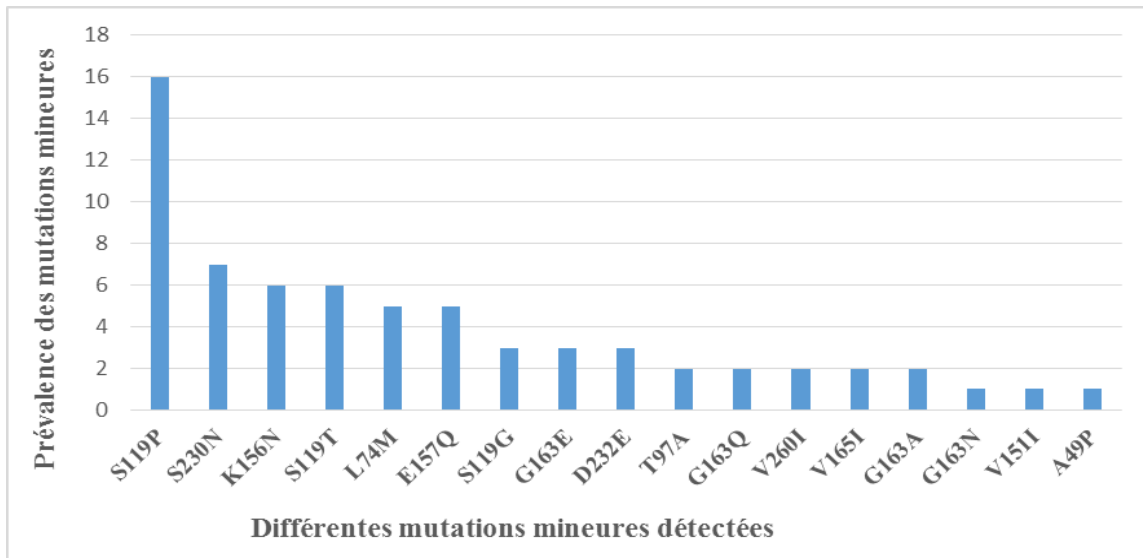


Figure 11 : Prévalence des différentes mutations mineures identifiées.

Certaines mutations mineures ont été trouvées, principalement liées à des sous-types B ou non-B spécifiques.

L74 M, E157Q, S119T, T97A étaient significativement plus fréquentes dans le sous-type CRF02_AG. Alors que S230N, K156N, V151I, étaient corrélées avec le sous type B.

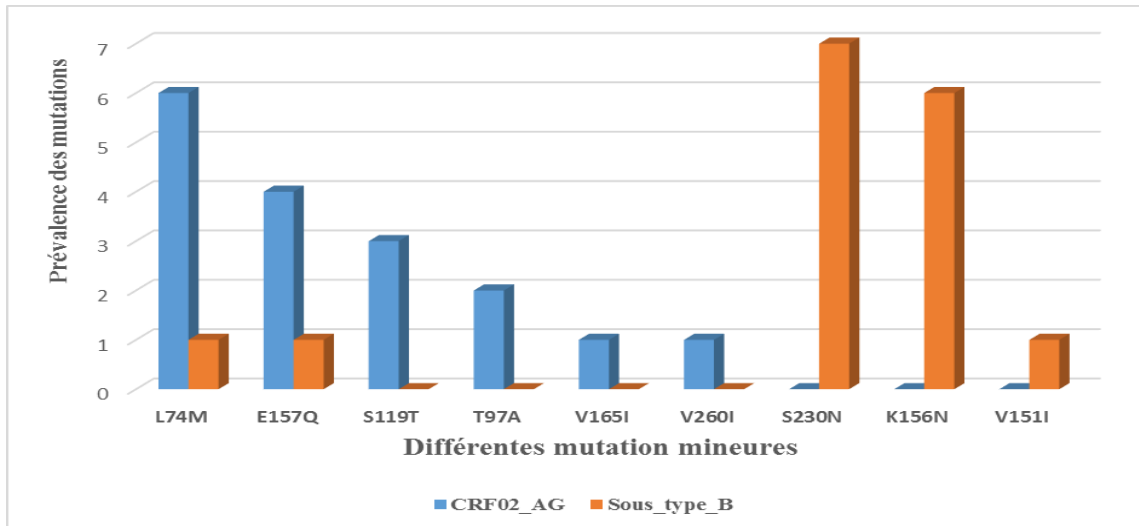


Figure 12 : Prévalence des mutations mineures en fonction des sous-types de VIH-1 identifiés.

Aucune mutation accessoire n'a été identifiée chez les sous-types C et D.

Dans notre étude, seules les mutations **E157Q**, **T97A** et **L74M** étaient associées à une sensibilité réduite des inhibiteurs de l'intégrase.

Selon les algorithmes ANRS, Stanford et Rega, la mutation **T97A** a été identifiée à 2,74% soit 2/73 séquences de sous-type CRF02_AG avec un P égale à 0,53 ; cependant aucune séquence de sous-types B ne portait cette mutation.

Selon les algorithmes ANRS et Stanford, la mutation mineure **E157Q** a été identifiée à 5,47% soit 4/73 séquences de sous-types CRF02_AG contre 1,38% soit 1/72 séquences de sous-types B avec un P égale à 0,47. Par contre selon l'algorithme Rega aucune séquence ne portait cette mutation.

Selon les algorithmes ANRS Et Stanford aucune séquence ne portait la mutation mineure **L74M**, mais l'algorithme Rega a détecté cette mutation mineure à 5,47% soit 4/ 3

séquences de sous-types CRF02_AG Contre 1,38% soit 1/72 séquences de sous-types B Avec un P égale à 0,47.

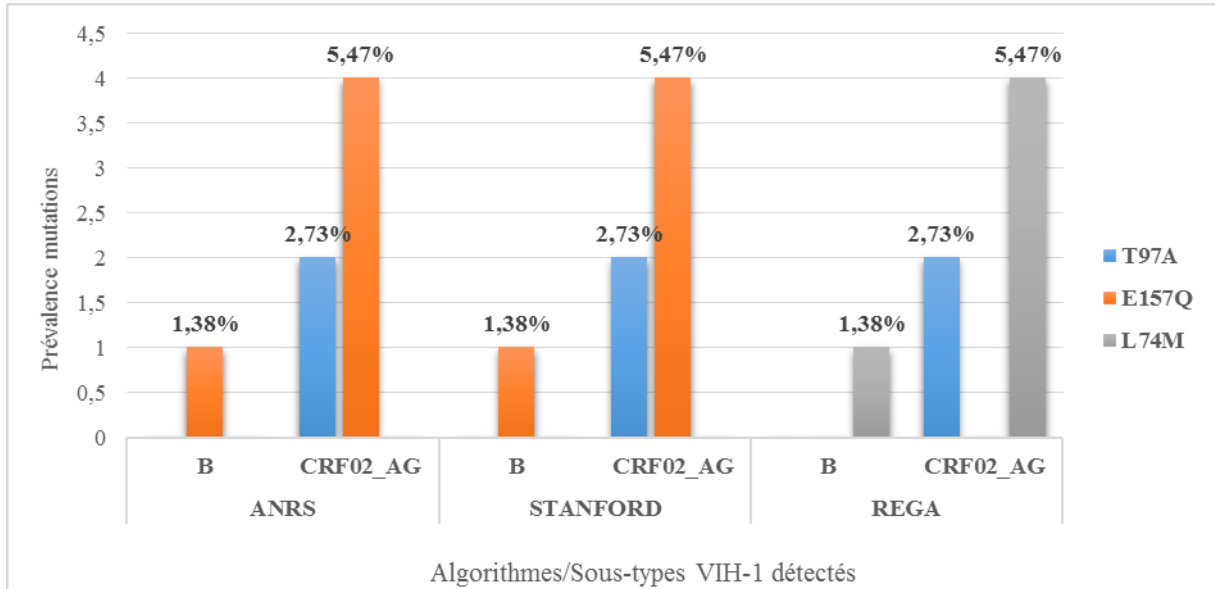


Figure 13 : Prévalence des trois mutations qui ont conféré de la résistance aux INI en fonction des sous-types de VIH 1 identifiés

Résistance aux différents Inhibiteurs d'Intégrase

Selon l'algorithme ANRS aucune mutation de résistance n'a été observée au Cabotégravir (CAB).

- L'algorithme ANRS a identifié 1,33% de résistances soit 5/15 Patients Porteurs de virus résistant au dolutégravir dose unique de 50mg/jr (DTG) tous avaient la mutation mineure E157Q.

Les mêmes patients avec la mutation mineure **E157Q** étaient résistants au dolutégravir double dose (DTG-BID) Et au Raltégravir.

4,6 % soit 7/150 Patients étaient résistants à l'Élitégravir dont 5 patients porteurs de virus avec la mutation **E157Q** et 2 patients avec la mutation **T97A**.

Le CAB et le DTG

BID n'étaient pas utilisés par les algorithmes Stanford et Rega au moment de notre analyse de données.

- L'algorithme de Stanford a détecté 4,66% soit 7/150 patients résistants à l'EVG et au RAL, 5 de ces patients portaient des virus avec la mutation E 57Q et 2 avaient la mutation T97A.

Aucune résistance n'a été observée au DTG selon l'algorithme Stanford contrairement à l'algorithme de Rega qui a détecté un patient résistant au DTG dose unique à cause de l'association de trois (3) mutations mineures de polymorphisme : L74M+T97A+T124A.

- L'algorithme Rega a détecté 2% soit 3/150 patients résistants au RAL dont un patient parmi les (3) avait l'association L74M+T97A+T206S et les deux autres avaient l'association L74M+T206S.

Aucune résistance à l'EVG n'a été observée par l'algorithme Rega.

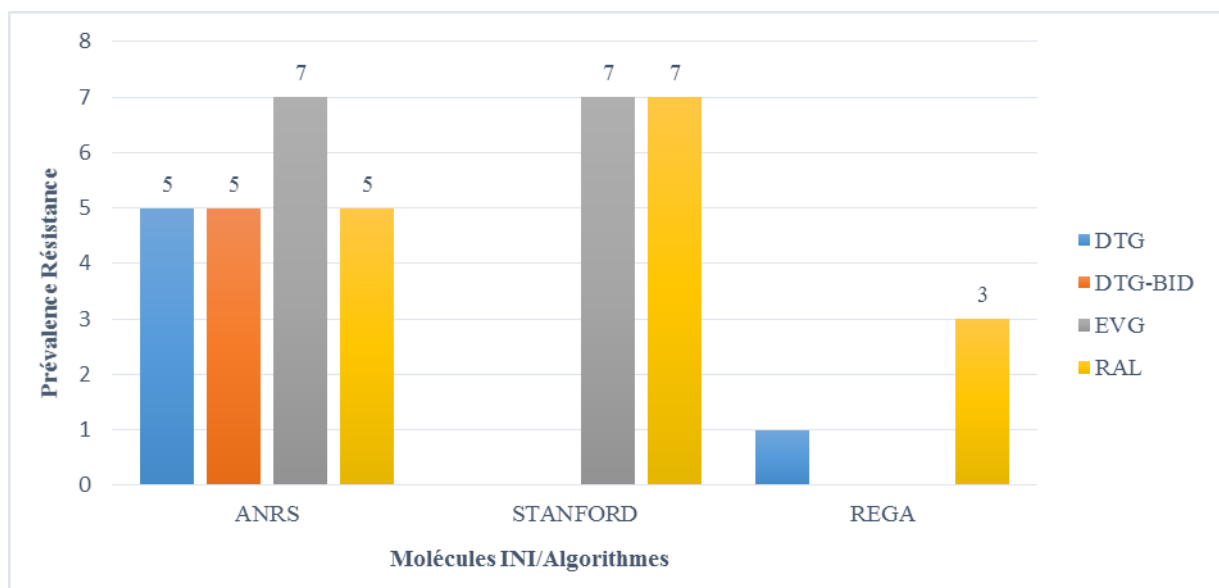


Figure 14: Prévalence de la résistance des INI selon les algorithmes ANRS, Stanford et Réga

En fonction des sous-types de VIH-1 identifié dans notre étude, nous avons observé plus de résistance aux différentes molécules d'inhibiteurs d'intégrase venant des sous-types CRF02_AG 8,22% (6/73) de résistance contre 1,39% (1/72) de résistance de sous-types B.

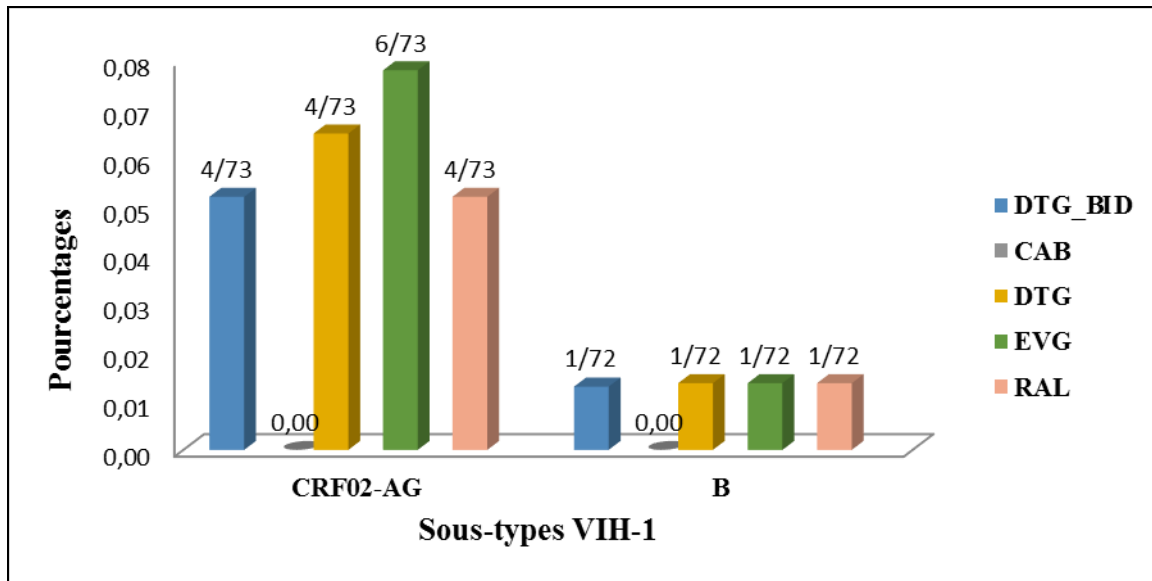


Figure 15 : Prévalence de la résistance des inhibiteurs d'intégrase en fonction des sous-types de VIH-1 identifiés selon l'algorithme de l'ANRS



*COMMENTAIRE ET
DISCUSSION*

VI. COMMENTAIRE ET DISCUSSION

L'algorithme d'interprétation ANRS a détecté majoritairement le sous-type recombinant CRF02-AG 48,67%, ceci est dû au fait que le CRF02-AG est le sous-type le plus prévalent au Mali (69). Suivi du sous-type B 48% qui est le plus répandu en France, suivi du sous-type A1 2% ; C 0,67% et D 0,67% détecté chez les patients du Mali.

À l'aide des algorithmes d'interprétation des séquences actuellement disponibles (ANRS, Stanford HIVdb et Rega), nous avons identifié la présence de mutations à quatorze (14) positions et seulement trois étaient associées à la résistance, notamment T124A (61,33%) ; T206S (56,67%), S119P (10,66%), S230N (4,66%), K156N (4%), S119T (4%), **E157Q (3,33%)**, **L74M (3,33%)**, S119T (2%), G163E (2%), D232E (2%), **T97A (1,33%)**, G163Q (1,33%), G163A (1,33%), V260I (1,33%), V165I (1,33%), V151I (0,66%), G163N (0,66%) et A49P (0,66%).

Tous sauf E157Q, T97A et L74M ont été considérés comme des mutations de résistance accessoires par les trois algorithmes d'interprétation ANRS Stanford et Rega.

E157Q identifié chez 3,33% des patients testés (5/150) a été sélectionné par l'algorithme ANRS en tant que mutation primaire qui seule confère une résistance au Dolutégravir (DTG) dose unique, au Dolutégravir double dose (DTG-BID), à l'Elvitégravir (EVG) et au Raltégravir (RAL) ce qui est en accord avec une étude réalisée en 2015 dans laquelle E157Q seule était associée à l'échec d'un régime contenant du DTG (70).

Cependant d'autres chercheurs ont enquêté sur cette association en 2016, mais n'ont pas pu confirmer ce résultat (71). D'autre part une étude plus récente a également montrée après six mois de traitement la non suppression de la virémie sous le seuil de détection de huit (8) patients, porteurs de la mutation E157Q initiés à un traitement à base de DTG (72).

Selon l'algorithme de Stanford HIVdb la mutation mineure E157Q confère de la résistance à l'Elvitégravir et au Raltégravir mais pas au Dolutégravir, ceci confirme les résultats d'une étude récente menée en Afrique du sud qui a montré une faible résistance à l'EVG et au RAL causée par la mutation mineure E157Q (73).

Par conséquent, la causalité entre E157Q et une sensibilité réduite du Dolutégravir est discutable et nécessite d'autres études de suivi à long terme.

La mutation mineure T97A a été identifiée chez 1,33% (2/150) ce qui est inférieure à celle observée en Afrique du sud 1,6% (73), sélectionnée par les algorithmes ANRS et Stanford HIVdb en tant que mutation polymorphe qui seule peut conférer une faible résistance à l'EVG et au RAL mais n'a pas d'impact sur la sensibilité au DTG (74–76). Par contre dans l'algorithme Rega la mutation T97A seule ne conférait pas de résistance aux INI.

La mutation L74M identifiée chez 5/150 (3,33%) des patients, 3/5 de ces patients ont été sélectionnés par l'algorithme Rega comme résistant au Raltégravir ; ceci pourrait être dû au fait que la mutation L74M était associée à d'autres mutations mineures T97A et T206S. Ce patient a probablement été contaminé par une PVVIH qui était sous Raltégravir. Ce résultat est similaire avec celui obtenu dans l'étude menée en Afrique du sud dans laquelle L74M a été retrouvée dans 3,4% des cas. Des résultats similaires ont été également observés au Brésil et en Europe avant l'utilisation généralisée des inhibiteurs d'Intégrase (77).

Il faut savoir que le polymorphisme L74M survient chez près de 10% des virus CRF02_AG provenant de patients n'ayant jamais reçu d'ARV. Cependant, il est par ailleurs polymorphe de façon minimale avec une prévalence naïve d'ARV comprise entre 0,3% et 3% dans les autres sous-types de VIH-1.

Dans notre étude la mutation L74M a été détectée à 5,48% chez les sous types CRF02_AG et à 1,38% chez les sous-types B, avec une différence statistiquement non significative $P > 0,05$. Ce qui concorde avec une étude qui a trouvé L74M à 0,6 % chez les sous-types non M (78). Ce polymorphisme est sélectionné chez les patients recevant le Raltégravir et l'Elvitégravir, et chez les patients RAL-expérimentés recevant un traitement de sauvetage DTG. En soi, il a un effet minime, voire aucun, sur la sensibilité des inhibiteurs d'Intégrase. Cependant, il réduit la sensibilité du Raltégravir en combinaison avec d'autres mutations de résistance aux INI.

Malgré l'absence de mutation de résistance majeure chez les patients naïfs de traitement ARV, elle peut apparaître sous traitement en particulier avec les INI de première génération. Comme l'a montré une étude chez un patient Sud-africain qui a grillé ses 3 lignes de traitement par l'inobservance. Il avait une résistance de haut niveau au RAL et de niveau élevé contre trois des quatre autres INI (79).

Un échec de traitement avec le Raltégravir peut conférer une résistance croisée à l'Elvitégravir et au Dolutégravir ceci pourrait être évité si les patients étaient traités initialement avec le Dolutégravir au lieu de Raltégravir (80).

Evaluation de la résistance primaire du VIH-1 aux inhibiteurs d'Intégrase

Les polymorphismes T124A et T206S étaient significativement prévalent chez les sous-types non B que chez le sous-type B 48% contre 44,97% avec une différence significative chacun car $P < 0,05$. Ce résultat est similaire à une étude dans laquelle T124A a été retrouvé à plus de 40% (81), mais ce résultat est supérieur à d'autres études dans les quelles T124A était prévalent de 25,8% et T206S de 6,8% (78). Malgré leur prévalence élevée ces deux polymorphismes n'ont pas eu d'impact sur la sensibilité des inhibiteurs d'intégrase.

Les mutations mineures qui ont été trouvées, principalement liées à des sous-types non-B ou B spécifiques

L74M, E57Q, T98A, S192T, V161I et V260I étaient significativement plus fréquentes dans le sous-type CRF02_AG. Alors que S230N, K156N, S119P, V151I, étaient corrélées avec le sous-type B. Une étude récente a également identifié des différences spécifiques au sous-type dans les profils de résistance croisée du Dolutégravir chez les patients échouant au traitement avec le Raltégravir (82). Les analyses de séquence et de structure ont montré que les effets spécifiques aux sous-types étaient causés par des résidus polymorphes dans les sous-types, ce qui influait significativement sur l'activité, la structure et la fonction des protéines.

Bien que le Dolutégravir ait montré une barrière génétique élevée à la résistance, des différences spécifiques de sous-type ont été observées dans la sélection des mutations de résistance au DTG.

Dans l'ensemble, nous avons obtenu une résistance primaire de 4,66% selon les algorithmes ANRS et STANFORD et 2% de résistance primaire selon l'algorithme REGA ceci pourrait s'expliquer par la petite taille de notre échantillon.

Dans notre étude nous avons observé une prévalence plus élevée de la résistance aux différents inhibiteurs d'Intégrase chez les sous-types CRF02_AG du Mali que chez le sous-type B de Paris ; ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'il y'a beaucoup plus de polymorphisme chez les sous-types CRF02_AG que chez le sous-type B et probablement les patients du Mali sous traitement portent des virus multi-résistants et nos patients naïfs de tout traitement ARV ont hérité ou ont été contaminés par ces virus multi-résistants.

L'une des causes de l'apparition de virus multi-résistants est l'inobservance des patients sous traitement ARV, ce travail confirme les résultats d'une analyse en fonction de l'ethnie (caucasienne, asiatique, africaine) qui a trouvé que l'évolution de la charge virale plasmatique et des lymphocytes T CD4+ était légèrement moins bonne pour les africains, non pas à cause d'un sous-type différent mais du fait d'une moins bonne observance. Une autre étude Française montre également une réduction similaire de la charge virale chez les patients infectés par des virus non B versus B à M3, M6, M12 après l'instauration du traitement. (83,84)

Il apparaît nécessaire d'insister sur l'observance auprès des patients et de surveiller plus attentivement les profils de résistance qui seront sélectionnés chez les patients en échec de ces nouveaux traitements.

Discordance des algorithmes

Dans notre étude nous avons utilisé trois algorithmes d'interprétations différentes ANRS, Stanford et Rega. Des discordances ont été observées entre les trois algorithmes : au niveau des molécules utilisées le Cabotégravir et le Dolutégravir double doses étaient prises en compte par l'algorithme de l'ANRS contrairement à celui de Stanford et de Rega ce qui concorde avec les données de Wagner, et de Vergne qui avaient trouvé un grand nombre d'écarts entre l'algorithme de l'ANRS et les deux autres (85,86).

Au niveau de la sensibilité des molécules l'algorithme de l'ANRS a détecté cinq (5) patients résistants au Dolutégravir dose unique et double dose, cinq (5) patients résistants au Raltégravir et sept (7) patients résistants à l'Elvitégravir. Alors que l'algorithme de Stanford a détecté sept (7) patients résistants au Raltégravir et à l'Elvitégravir et aucun patient résistant au Dolutégravir enfin l'algorithme de Rega a détecté un (1) patient résistant au Dolutégravir, trois (3) patients résistants au Raltégravir et aucun patient résistant à l'Elvitégravir.

Ces discordances peuvent s'expliquer par les désaccords dans l'interprétation des séquences et la détection des mutations de résistance.

Ces niveaux de discordances sont toujours observés même avec l'interprétation des autres classes d'antirétroviraux notée par Deldalle pour son diplôme d'étude spécialisée de biologie médicale (87) et Maiga et al qui ont trouvé un taux élevé de discordance entre les algorithmes (7).

LIMITE DE L'ETUDE

Un plus grand nombre d'échantillons collectés dans les différents sites de prise en charge sur l'étendue du territoire malien aurait permis de connaître réellement les souches VIH-1 circulant au Mali.

L'absence de certaines données telles que les marqueurs virologiques (charge virale) et immunologiques (taux de LT CD4+), les paramètres sociodémographiques (l'âge et le sexe) n'ont pas aidé à une analyse approfondie.



*CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS*

VII. CONCLUSION

Dans notre étude nous avons analysé 150 séquences ; ce qui a permis de trouver une résistance primaire de 4,66% selon les algorithmes ANRS et Stanford et une résistance primaire de 2% selon l'algorithme Rega aux différents inhibiteurs d'intégrase.

Une prévalence très élevée du sous-type CRF02_AG 93,50% des 77 séquences des patients du Mali, et une prévalence très élevée du sous-type B 98,63% des 73 séquences des patients de Paris.

Plusieurs mutations polymorphiques ont été détectées, parmi lesquelles les mutations mineures E157Q, T92A, L74M qui ont été responsables de résistance chez respectivement 3,33%, 1,33%, 3,33% des patients aux différents inhibiteurs d'intégrase.

Nos données montrent un faible niveau de résistance aux inhibiteurs d'intégrase et que leur introduction en traitement de première ligne pourrait se faire sans recours à un test de génotypage avant la mise sous traitement. Cependant la surveillance de cette résistance primaire devrait se faire régulièrement et à un large niveau et nous devons rester vigilent malgré la différence d'algorithme.

VIII. RECOMMANDATIONS

Aux vu de ces résultats et pour avoir une bonne réponse au traitement antirétroviral avec les inhibiteurs d'Intégrase, il est important de surveiller la résistance primaire. Pour cela nous recommandons à l'endroit :

✚ Au Haut conseil National de lutte contre le Sida et à la Cellule Sectorielle de lutte contre le Sida

- Renforcer la promotion pour le dépistage du VIH.
- Instaurer le Dolutégravir en traitement de 1^{ère} ligne.
- Rendre accessible les ressources humaines, matérielles et financières pour la continuité des tests de génotypage ;

✚ Aux Pharmaciens, Biologistes, et personnels des laboratoires d'analyses biomédicales

- Faire respecter les protocoles thérapeutiques aux prescripteurs
- Assurer la bonne collecte des échantillons et leurs conservations ;
- Publier les résultats des études pour informer les décideurs et la communauté scientifique internationale.

✚ Aux Partenaires techniques et financiers

- Appuyer les laboratoires et les institutions de recherche en finançant les recherches;
- Financer les inhibiteurs d'intégrase
- Instaurer des formations continues du personnel.

✚ A la Population, et aux Personnes vivant avec le VIH/SIDA

- S'informer sur leurs statuts sérologiques et ne pas stigmatiser les PVVIH ;
- Etre adhérent aux traitements pour un meilleur succès thérapeutique et pour la protection des autres.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):868-71.
2. VIH/sida [Internet]. World Health Organization 2018 [cité 25 oct 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
3. EDSM V [Internet] 2013 [cité 11 oct 2018]. Disponible sur: <http://www.sante.gov.ml/index.php/annuaires/download/8-enquetes-demographiques-de-sante/4-eds-v-2013>
4. Henquell C, Jacomet C, Antoniotti O, Chaib A, Regagnon C, Brunet S, et al. Difficulties in diagnosing group o human immunodeficiency virus type 1 acute primary infection. *J of Clin Microbiol* 2008; 46(7):2453-6.
5. Loussert-Ajaka I, TD L, ML C, D I, S S, AM C, et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* 1994;343(8910):1393-4.
6. Peeters M, Delaporte E. Diversité génétique de l'infection à VIH dans le monde et ses conséquences. *Med Trop* 1999;59(4):449-55.
7. Maiga A. Evaluation de la fréquence de virus résistants chez les personnes vih-1 positifs initiant un premier traitement antiretroviral à bamako: USTTB (Faculté de Pharmacie); 2018;51.
8. Ngo-Giang-Huong N, Hoang Khanh T, Dagnra A, D'Aquin T, Maiga AI. HIV pre-treatment drug resistance in West Africa and Suth-East Asia. *IAS* 2017;
9. Grant PM, Zolopa AR. Optimal antiretroviral therapy: HIV-1 treatment strategies to avoid and overcome drug resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(8):901-10.
10. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 1991;67(6):1211-21.

11. Rice P, Craigie R, Davies DR. Retroviral integrases and their cousins. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6(1):76-83.
12. Lataillade M, Kozal MJ. The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS* 2006;20(7):489-501.
13. Skalka AM. Retroviral DNA Transposition: Themes and Variations. *Microbiol Spectr* 2014;2(5):30005.
14. Blumenthal R, Durell S, Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J Biol Chem* 2012;287(49):40841-9.
15. Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. [HIV genetic diversity and its consequences]. *Pathol Biol*.2009;57(2):142-8.
16. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2015;13(8):471-83.
17. Mirambeau G, Lyonnais S, Gorelick RJ. Features, processing states, and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA Biol* 2010;7(6):724-34.
18. Thomas JA, Gorelick RJ. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res* 2008;134(1-2):39-63.
19. Friedrich M, Setz C, Hahn F, Matthaei A, Fraedrich K, Rauch P, et al. Glutamic Acid Residues in HIV-1 p6 Regulate Virus Budding and Membrane Association of Gag. *Viruses* 2016;8(4):117.
20. Cousins MM, Laeyendecker O, Beauchamp G, Brookmeyer R, Towler WI, Hudelson SE, et al. Use of a high resolution melting (HRM) assay to compare gag, pol, and env diversity in adults with different stages of HIV infection. *PLoS ONE* 2011;6(11):27211.
21. Könnnyű B, Sadiq SK, Turányi T, Hírmondó R, Müller B, Kräusslich H-G, et al. Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. *PLoS Comput Biol* 2013;9(6):1003103.

22. Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 2010;91(1):1-12.
23. Musinova YR, Sheval EV, Dib C, Germini D, Vassetzky YS. Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(3):589-601.
24. Groom HCT, Anderson EC, Dangerfield JA, Lever AML. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Gen Virol* 2009;90(5):1141-7.
25. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003;424(6944):99-103.
26. Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virol* 1995;206(2):935-44.
27. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* 2005;15(11):923-34.
28. Larrouy L, Brun-Vézinet F, Descamps D. Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase. *Virol* 2010;14(2):119-28.
29. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657-700.
30. Weiss RA. HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB Life* 2002;53(4-5):201-5.
31. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(8):6866.
32. Hu W-S, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(10):6882.
33. Hestand MS, Van Houdt J, Cristofoli F, Vermeesch JR. Polymerase specific error rates and profiles identified by single molecule sequencing. *Mutat Res* 2016;784(785):39-45.

34. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 2015;13(8):484-96.
35. Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):97-107.
36. Proust A. Study of HIV-1 transfer from antigen presenting cells to primary CD4 T lymphocytes and inhibition by neutralizing antibodies [Internet]. ResearchGate 2013 [cité 27 nov 2018].
37. Engelman A, Bushman FD, Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J* 1993;12(8):3269.
38. Zhao Z, McKee CJ, Kessl JJ, Santos WL, Daigle JE, Engelman A, et al. Subunit-specific protein footprinting reveals significant structural rearrangements and a role for N-terminal Lys-14 of HIV-1 Integrase during viral DNA binding. *J Biol Chem* 2008;283(9):5632-41.
39. Van den Ent FM, Vos A, Plasterk RH. Dissecting the role of the N-terminal domain of human immunodeficiency virus integrase by trans-complementation analysis. *J Virol* 1999;73(4):3176-83.
40. Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* 1992;66(11):6361-9.
41. Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* 1992;12(5):2331-8.
42. Lutzke RA, Plasterk RH. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. *J Virol* 1998;72(6):4841-8.

43. Bushman FD, Craigie R. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4):1339-43.
44. Brin E, Yi J, Skalka AM, Leis J. Modeling the late steps in HIV-1 retroviral integrase-catalyzed DNA integration. *J Biol Chem* 2000;275(50):39287-95.
45. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(3):236-48.
46. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* 2014;384(9939):258-71.
47. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 2006;368(9534):489-504.
48. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet* 2010;26(3):119-31.
49. Centers for Disease Control (CDC). Provisional Public Health Service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1985;34(1):1-5.
50. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288(5463):55-6.
51. Li G, Piampongsant S, Faria NR, Voet A, Pineda-Peña A-C, Khouri R, et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology* 2015;12(18):12977-015.
52. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15(8):871-2.
53. Bocket L, Cheret A, Deuffic-Burban S, Choisy P, Gerard Y, de la Tribonnière X, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. *Antivir Ther* 2005;10(2):247-54.

54. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012;18(3):182-92.
55. Onusida. Les chiffres mondiaux du VIH: des progrès et des défis | Vih.org [Internet] 2017 [cité 11 oct 2018]. Disponible sur: <http://vih.org/20170721/chiffres-mondiaux-du-vih-progres-et-defis/139489>
56. Mitsuya H, Jarrett RF, Matsukura M, Di Marzo Veronese F, DeVico AL, Sarngadharan MG, et al. Long-term inhibition of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2',3'-dideoxynucleosides in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(7):2033-7.
57. Tressler R, Godfrey C. NRTI backbone in HIV treatment: will it remain relevant? *Drugs* 2012;72(16):2051-62.
58. Johnson AA, Ray AS, Hanes J, Suo Z, Colacino JM, Anderson KS, et al. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 2001;276(44):40847-57.
59. Pöhlmann S, Doms RW. Evaluation of current approaches to inhibit HIV entry. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2(1):9-16.
60. Pöhlmann S, Doms RW. Evaluation of current approaches to inhibit HIV entry. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2(1):9-16.
61. Jiang S, Zhao Q, Debnath AK. Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr Pharm Des* 2002;8(8):563-80.
62. L. Greenberg M, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV inhibitor 2004;54(2):333-40.
63. Grivel J-C, Shattock RJ, Margolis LB. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med* 2011;9(1):6.
64. Antiviraux : Les points essentiels [Internet]. Site du collège National de Pharmacologie médicale 2018 [cité 11 oct 2018]. Disponible sur:

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antiviraux-les-points-essentiels>

65. WHO. WHO | Treatment and care [Internet]. WHO 2017 [cité 11 oct 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/>
66. Anstett K, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology* 2017;14(1):36.
67. Rhee S-Y, Liu TF, Kiuchi M, Zioni R, Gifford RJ, Holmes SP, et al. Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology* 2008;5(74):1742-4690.
68. Quashie PK, Oliviera M, Veres T, Osman N, Han Y-S, Hassounah S, et al. Differential effects of the G118R, H51Y, and E138K resistance substitutions in different subtypes of HIV integrase. *J Virol* 2015;89(6):3163-75.
69. Derache A, Maiga A-I, Traoré O, Akonde A, Cissé 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. *J Antimicrob Chemother* 2008;456-463.
70. Danion F, Belissa E, Peytavin G, Thierry E, Lanternier F, Scemla A, et al. Non-virological response to a dolutegravir-containing regimen in a patient harbouring a E157Q-mutated virus in the integrase region. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(6):1921-3.
71. Anstett K, Cutillas V, Fusco R, Mesplède T, Wainberg MA. Polymorphic substitution E157Q in HIV-1 integrase increases R263K-mediated dolutegravir resistance and decreases DNA binding activity. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(8):2083-8.
72. Neogi U, Singh K, Aralaguppe SG, Rogers LC, Njenda DT, Sarafianos SG, et al. Ex-vivo antiretroviral potency of newer integrase strand transfer inhibitors cabotegravir and bictegravir in HIV type 1 non-B subtypes. *AIDS* 2018;32(4):469-76.
73. Brado D, Obasa AE, Ikomey GM, Cloete R, Singh K, Engelbrecht S, et al. Analyses of HIV-1 integrase sequences prior to South African national HIV-treatment program and

- availability of integrase inhibitors in Cape Town, South Africa. *Scientific Reports* 2018;8(1):4709.
74. Abram ME, Ram RR, Margot NA, Barnes TL, White KL, Callebaut C, et al. Lack of impact of pre-existing T97A HIV-1 integrase mutation on integrase strand transfer inhibitor resistance and treatment outcome. *PLoS ONE* 2017;12(2):172206.
 75. Malet I, Delelis O, Valantin M-A, Montes B, Soulie C, Wirden M, et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1351-8.
 76. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* 2008;82(2):764-74.
 77. Casadellà M, van Ham PM, Noguera-Julian M, van Kessel A, Pou C, Hofstra LM, et al. Primary resistance to integrase strand-transfer inhibitors in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(10):2885-8.
 78. Meixenberger K, Yousef KP, Smith MR, Somogyi S, Fiedler S, Bartmeyer B, et al. Molecular evolution of HIV-1 integrase during the 20 years prior to the first approval of integrase inhibitors. *Virology* 2017;14(223):12985-017.
 79. Rossouw TM, Hitchcock S, Botes M. The end of the line? A case of drug resistance to third-line antiretroviral therapy. *South Afr J HIV Med* 2016;17(1):454.
 80. Fourati S, Charpentier C, Amiel C, Morand-Joubert L, Reigadas S, Trabaud M-A, et al. Cross-resistance to elvitegravir and dolutegravir in 502 patients failing on raltegravir: a French national study of raltegravir-experienced HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(5):1507-12.
 81. Vavro C, Hasan S, Madsen H, Horton J, DeAnda F, Martin-Carpenter L, et al. Prevalent Polymorphisms in Wild-Type HIV-1 Integrase Are Unlikely To Engender Drug Resistance to Dolutegravir (S/GSK1349572). *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(3):1379-84.

82. Doyle T, Dunn DT, Ceccherini-Silberstein F, De Mendoza C, Garcia F, Smit E, et al. Integrase inhibitor (INI) genotypic resistance in treatment-naïve and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(11):3080-6.
83. Bocket L, Burban S, Cheret A. Impact of HIV type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. *Antivir Ther.* 2005;10(2):247-54.
84. H.J. F. VIH-1, sous-types et CRF : différence dans la réponse aux traitements et la résistance aux antirétroviraux. *La lettre de l'infectiologie* 2011;XXVI(5):204-10.
85. Vergne L, Snoeck J, Avelin A. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naïve and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46(1):53-62.
86. Wagner S, Klimkait T, Kurz M. Algorithm evolution for drug resistance prediction: Comparison of systems for HIV-1 genotyping. *Antivir Ther* 2015;20(6):661-5.
87. Deldalle J. Génotypage de résistance du VIH-1 chez les patients naïfs : apport du séquençage de l'ADN par méthode Sanger et de l'ARN par séquençage haut débit [Internet] 2017 [cité 4 oct 2018].



ANNEXE

Annexe

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : DAO

Prénom : DORCAS GNEKOUN

Nationalité : MALIENNE

Section : PHARMACIE

Email : daodorcas06@gmail.com

Téléphone : 00 223 77 52 56 34 / 63 60 08 20

Secteurs d'intérêt : Maladies infectieuses,
Microbiologie, Santé Publique,
Ethique de la recherche scientifique

Titre : Evaluation de la
résistance primaire du VIH-1
aux inhibiteurs d'intégrase

Ville de soutenance :

BAMAKO/MALI

Lieu de dépôt : Bibliothèque
de la Faculté de Pharmacie

Année : 2017-2018

Résumé :

Le but de cette étude était d'évaluer la fréquence de virus résistants aux inhibiteurs de l'intégrase chez les patients VIH-1 naïfs de traitement antirétroviral.

Notre étude a été menée de Juin à Novembre 2013 au centre de recherche et de formation sur le VIH/SIDA et la tuberculose (UCRC/SEREF0) à l'USTTB/Mali. Elle concernait 150 séquences de patients séropositifs naïfs de tout traitement ARV parmi lesquelles 77 séquences de VIH-1 provenaient de patients du Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseils (CESAC) de Bamako et 73 séquences venaient de patients de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière de Paris. Le génotypage a été réalisé par la technique maison de l'ANRS et les séquences ont été analysées par trois algorithmes, celui de l'ANRS, de STANFORD et de REGA.

Le sous type recombinant CRF02_AG a été majoritairement détecté avec 48,67% puisque cette forme recombinante est le plus prévalent des sous types de VIH-1 au Mali ; suivi du sous type B qui a été détecté à 48% car c'est le plus prévalent en France suivie du sous-type A1 2% ; C 0,67% et D 0,67% détecté chez les patients du Mali. À l'aide des algorithmes d'interprétation, aucune mutation majeure de résistance n'a été observée mais, nous avons identifié la présence de mutations mineures à quatorze (14) positions, notamment T124A (61,33%) ; T206S (56,67%) ; S119P (10,66%), S230N (4,66%) ; K156N et S119T (4%) ; E157Q et L74M (3,33%) ; S119T, G163E et D232E (2%) ; T97A, G163Q, G163A, V260I et

V165I (1,33%), V151I, G163N et A49P (0,66%). Parmi ces polymorphismes seuls trois ont été associés à une résistance aux inhibiteurs de l'intégrase E157Q, T92A, L74M. Les mutations mineures L74 M, E157Q, T97A, S119T, V165I et V260I étaient significativement plus fréquentes dans le sous-type CRF02_AG. Alors que S230N, K156N, S119P, V151I, étaient corrélées avec le sous type B. Nous avons observé une prévalence plus élevée de la résistance aux différents inhibiteurs d'intégrase chez les sous-types CRF02_AG du Mali 8,22% que chez le sous-type B de Paris 1,39%. Dans l'ensemble nous avons obtenu une résistance primaire aux inhibiteurs de l'intégrase de 4,66% selon les algorithmes ANRS et STANFORD et 2% de résistance primaire selon l'algorithme REGA.

Nos données suggèrent que l'introduction de cette classe d'ARV en particulier les inhibiteurs d'intégrase de deuxième génération, le Dolutégravir en première ligne de traitement pourrait aider à gérer l'épidémie de VIH au Mali et aider aussi dans l'atteinte des 3×90 de l'ONUSIDA. Nos données suggèrent également la nécessité d'une surveillance adéquate de la pharmaco-résistance afin de suivre l'évolution du virus sous la pression d'un nouveau médicament.

Mots clé : VIH-1, Résistance primaire, Inhibiteurs d'intégrase, Mutations

IDENTIFICATION SHEET

Last name: DAO

First name: DORCAS GNEKOUN

Nationality: MALIAN

Section: Pharmacy

Email: dorcasdao06@gmail.com

Contact: 00 223 77 52 56 34/63 60 08 20

Focus Area: Infectious Diseases,

Microbiology, Public Health,

Ethics of scientific research

Abstract:

The purpose of this study was to evaluate the frequency of integrase inhibitor-resistant viruses in antiretroviral-naïve HIV-1 patients.

Our study was conducted from June to November 2013 at the HIV/AIDS and Tuberculosis Research and Training Center (UCRC / SEREFO) at the USTTB/Mali. It involved 150 sequences of HIV-positive patients naïve to any ARV treatment among which 77 sequences of HIV-1 came from patients of the Listening, Care, Animation and Counseling Center (CESAC) and 73 sequences came from patients of the Hospital Pitié-Salpêtrière of Paris. The genotyping was performed by the ANRS proprietary technique and the sequences were analyzed by three algorithms, that of the ANRS, STANFORD and REGA.

The recombinant subtype CRF02_AG was mostly detected with 48.67% since this recombinant form is the most prevalent subtype of HIV-1 in Mali; followed by subtype B which was detected at 48% because it is the most prevalent in France followed by the A1 2% subtype; C 0.67% and D 0.67% detected in patients from Mali. Using interpretation algorithms, no major resistance mutations were observed, but we identified the presence of minor mutations at fourteen (14) positions, including T124A (61.33%); T206S (56.67%); S119P (10.66%), S230N (4.66%); K156N and S119T (4%); E157Q and L74M (3.33%); S119T, G163E and D232E (2%); T97A, G163Q, G163A, V260I and V165I (1.33%), V151I, G163N and A49P (0.66%). Of these polymorphisms only three were associated with

Title: Evaluation of the primary resistance of HIV-1 to integrase inhibitors

City of defense:

BAMAKO/MALI

Place of deposit: Library of the Faculty of Pharmacy

Academic Year: 2017-2018

resistance to integrase inhibitors E157Q, T92A, L74M. The minor mutations L74M, E157Q, T97A, S119T, V165I and V260I were significantly more common in the CRF02_AG subtype. While S230N, K156N, S119P, V151I, were correlated with subtype B. We observed a higher prevalence of resistance to different integrase inhibitors in the Mali CRF02_AG subtypes 8.22% than in the Paris subtype B 1.39%. Overall, we obtained a primary resistance to integrase inhibitors of 4.66% according to the ANRS and STANFORD algorithms and 2% primary resistance according to the REGA algorithm.

Our data suggest that the introduction of this class of ARVs in particular second-generation integrase inhibitors, Dolutégravir as a first-line treatment, could help manage the HIV epidemic in Mali and also help in achieving the three times four twenty ten UNAIDS. Our data also suggest the need for adequate monitoring of drug resistance to monitor the evolution of the virus under the pressure of a new drug.

Key words: HIV-1, Primary Resistance, Integrase Inhibitors, Mutations

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens 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.»

Je le jure