

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur et de la  
Recherche Scientifique

REPUBLIQUE DU MALI  
**Un Peuple-Un But-Une Foi**



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO  
FACULTE DE PHARMACIE (FAPH)



Année universitaire : 2017-2018

N° ...../P

## TITRE

**Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.**

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le 18/05/2018

Devant le jury de la Faculté de Pharmacie

Par : M. Abdourhamane Alhousseini MAIGA

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie**

**(Diplôme d'Etat)**

## JURY

Président : Pr Hamar Alassane TRAORE  
Membre: Dr Garan DABO  
Co-directeur: Dr Almoustapha Issiaka MAIGA  
Directeur de thèse : Pr Daouda Kassoum MINTA

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE**  
**FACULTE DE PHARMACIE**  
**ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN :** M. Boubacar TRAORE - Professeur

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

**SECRETAIRE PRINCIPAL :** M. Seydou COULIBALY Administrateur Civil

**AGENT COMPTABLE :** M. Famalé DIONSAN Inspecteur des Finances

**PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
7	Moussa	HARAMA	Chimie Organique (décédé)
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
9	Alou A.	KEÏTA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
13	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Alassane	DICKO	Santé Publique
5	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
6	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
7	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
3	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
4	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
6	Ousmane	TOURE	Santé Publiq/Santé environnement

### 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
6	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
7	Kléitgui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
8	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
9	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
10	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
11	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie virologie
12	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Biostatistiques
13	Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
14	Birama Apho	LY	Santé publique
15	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
16	Issaka	SAGARA	Santé publique/ Biostatistiques
17	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
19	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé publique/ Biostatistiques

### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
3	Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd.
4	Issa	DIARRA	Immunologie
5	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
6	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
7	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

8	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
9	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé <b>Environnement</b>
10	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
11	Yacouba	MAÏGA	Bio statistique
12	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
13	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
14	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

## **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
7	Moussa	SANOGO	Gestion
8	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
3	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie
5	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Assitan	KALOGA	Législation
8	Ahmed	MAÏGA	Législation
9	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
10	Aboubacar	SANGHO	Législation
11	Bourama	TRAORE	Législation
12	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
13	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
14	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
15	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

#### DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

##### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
2	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

##### 2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie <b>Chef de DER</b>

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

### 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
4	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
6	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
7	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
8	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
9	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie analytique
10	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
11	Dougoutigui	TANGARA	Chimie analytique

## DER : SCIENCES FONDAMENTALES

### 1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>Chef de DER</b>
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

## 2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

## 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

## 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

## CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

13	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Virologie
14	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
15	Modibo	SANGARE	Anglais
16	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
17	Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
18	Fana	TANGARA	Maths
19	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies médicales
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

## DEDICACES

Je rends grâce,

- ❖ A Allah : le Tout Puissant, le maître des créatures.

Loué soit-il de m'avoir permis de réaliser ce travail dans la santé et la quiétude.

Qu'il nous guide sur le droit chemin et qu'il nous accorde sa grâce. Amen!

- ❖ Au prophète Mohamad, que le salut et la paix d'Allah soit sur lui, sur sa famille, sur ses compagnons ainsi que sur tous ceux qui l'ont suivi jusqu'au jour du jugement dernier.

Je dédie ce travail :

- A mon père : El Hadj Alhousseini MAIGA

Hacha ! Les mots ne sauront décrire tout ce que j'ai sur le cœur. Tu m'as toujours offert le meilleur de toi pour que je puisse étudier et découvrir l'immensité de la connaissance scientifique. Hacha est un homme qui a cultivé le sens de l'honneur, de la dignité, de la droiture, le sens du moral et du travail bien fait. Merci cher père que Dieu me donne la possibilité de suivre tes pas et qu'il te prête longue vie pour que tu puisses bénéficier du fruit de ton dévouement.

- A ma mère : feu Safi Boubo MAIGA

Chère Mère ! Tu as quitté ce monde ici-bas le 16 septembre 2016 à 19H

Les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour tous tes efforts consentis depuis mes premiers pas dans ce monde jusqu'au jour où la mort nous sépare mais je me souviendrais de cette femme qui a su développer le sens de l'honneur, de la dignité, de la droiture, le sens du moral et du travail bien fait. Chère mère merci, merci pour l'éducation et l'amour reçus et tes prières sans cesse. J'aurais souhaité te voir parmi nous aujourd'hui mais le Tout Puissant en a décidé autrement. Que ton âme repose en paix !

- A ma maman : Inna dite Madame

Humble, laborieuse, courageuse, pleine de patience, de sagesse et de dignité, merci maman pour vos conseils et bénédictions qu'Allah te prête encore longue vie afin qu'à notre tour, nous puissions te témoigner notre reconnaissance.

- A mon épouse : Sohoye S MAIGA

Simple, souriante, belle, compréhensive, pleine de patience et dignité, merci ma femme pour ton amour et ton soutien permanent qu'Allah nous donne longue vie.

## **REMERCIEMENTS**

A l'endroit de ma famille :

Je remercie toute la famille MAIGA pour son soutien sans cesse.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à mes sœurs et frères : Maimouna dite Mounna, Haoula, Madina, Ingénieur Yéhiya, Dr Ibrahim, Dr Issouf, Abdoulaye dit Hatchi, Dr Daouda, Mahamadine dit Papa, Wombey, Dr Zeina, Aminta, Hassoulla, Anassa qui n'ont ménagé aucun effort pour que nous arrivions à ce jour. Que la fraternité qui nous unit triomphe toujours et que Dieu nous prête santé et longévité dans le bonheur.

Je remercie mes beaux-frères : Zakaria, Attaher dit Para, Silhadine, vous m'avez apporté un grand soutien moral et matériel durant ces longues années d'études, mes belles sœurs, ainsi que mes neveux et nièces, trouvez dans ce travail un repère, armez-vous de patience et de volonté, le monde actuel oblige que Dieu nous donne longue vie et courage ! Sans oublier mes cousins, cousines, et mes amis ce modeste travail est le vôtre.

A l'endroit de l'équipe de SEREFO :

Au Dr Almoustapha MAIGA pour m'avoir accepté dans son équipe et proposé mon sujet de thèse.

Cher maître, trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance Béro.

Au Dr Oumar DOLO, Dr Josué TOGO, Dr Fatoumata Tata TRAORE, Arkietou, Dorcas, Dr Fatoumata TELLY T, pour votre apport si considérable dans la réalisation de ce travail et votre soutien sans faille.

A tout le personnel de SEREFO pour son aide tout au long de ce travail.

Au corps professoral de la faculté de Pharmacie et de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie pour l'enseignement reçu, ce travail est le sien.

A la pharmacie ASAHI : Dr TAMBOURA Saguinatou COULIBALY, merci de m'avoir reçu chez vous et de m'avoir enseigné les principes du métier. A tout le personnel recevez toute ma gratitude.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**A notre maître et président du jury**

**Professeur Hamar Alassane Traoré**

- ❖ **Professeur titulaire de médecine interne**
- ❖ **Chef de service de médecine interne du CHU du point G**
- ❖ **Coordinateur du DES de médecine interne du CHU du point G**
- ❖ **Responsable des cours de thérapeutique et de sémiologie médicale à la FMOS de Bamako**
- ❖ **Président de la Société Africaine de Médecine Interne (SAMI)**
- ❖ **Ancien président de la commission médicale d'établissement du CHU du point G**
- ❖ **Membre titulaire de l' Académie des Sciences du Mali**
- ❖ **Chevalier de l'Ordre National du Mali**

**Cher maître**

En acceptant de présider ce jury, vous nous faites honneur. Nous avons été marqués par votre grande simplicité, vos qualités humaines et votre rigueur scientifique dans l'exercice de la médecine font de vous un maître admiré et respecté. Recevez par ce travail, respectueux Maître, le témoignage de notre admiration ; longue vie, et santé !

**A notre maître et juge**

**Dr Garan DABO**

- ❖ **Médecin Infectiologue**
- ❖ **Maître Assistant à la FMOS**
- ❖ **Certifié en épidémiologie**
- ❖ **Membre de la Société Africaine de Pathologie Infectieuse (SAPI)**
- ❖ **Membre de l'Association Marocaine des Maladies auto-immunes**

**Cher Maître,**

Nous avons été touchés par votre amour du travail bien fait et votre grande simplicité.

Votre modestie, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines font de vous un maître admiré et respecté.

L'honneur est notre de vous avoir comme membre et juge, plaise à Dieu de vous accorder longévité, santé et bonheur.

**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 SEREFO**
- ❖ **Chef du Laboratoire d'Analyses Médicales du CHU Gabriel Touré**
- ❖ **Chef du Département de Biologie Médicale du CHU Gabriel Touré**
- ❖ **Secrétaire General, de l'Association Africaine de lutte contre la Résistance au Antimicrobiens (AARAM)**
- ❖ **Vice-Président du comité scientifique du VIH au Mali**
- ❖ **Membre de plusieurs sociétés savantes internationales sur le VIH dans le monde**
- ❖ **Enseignant vacataire à la faculté de pharmacie**
- ❖ **Chargé de Recherche au Gabriel Touré**

**Cher Maître,**

Vous avez guidé nos pas dans la recherche et nous ont conduit pas à pas dans l'élaboration de cette thèse. Ce travail est sans doute le fruit de votre volonté, et de votre disponibilité. Vos qualités d'homme scientifique ne souffrent d'aucune contestation et votre générosité font de vous un maître de référence.

Ce fut un privilège pour nous de bénéficier de vos enseignements tant scientifique que du savoir être et du savoir vivre. Trouvez dans ce travail toute notre reconnaissance et notre fidèle attachement.

Plaise à Dieu de vous les rendre au centuple.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**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**
- ❖ **Vice-président de la société Africaine de Pathologies Infectieuses**
- ❖ **Président du comité scientifique du VIH au Mali.**

**Cher Maître,**

Vous nous faites un insigne honneur en acceptant de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre simplicité, votre rigueur, vos qualités humaines font de vous un homme respecté.

Nous garderons de vous, cher Maître, l'image d'un homme de science, de culture, de principe.

Nous vous savons gré de tous les efforts fournis pour notre formation

# Table des Matières

## Contenu

1. INTRODUCTION .....	1
2. OBJECTIFS .....	3
2.1. Objectif principal :.....	3
2.2. Objectifs spécifiques : .....	3
3. Généralités .....	4
3.1. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) .....	4
3.1.1. Historique de la découverte du VIH /Sida.....	4
3.1.2. Définition et classification du VIH/Sida.....	4
3.1.3. Structure et morphologie du VIH .....	4
3.1.4. Stabilité physico-chimique .....	5
3.1.5. Cycle de réplication .....	5
3.1.6. Cellules cibles et réservoir du virus.....	7
3.1.7. Mode de transmission et Evolution naturelle de la maladie .....	7
3.1.7.1. Mode de transmission .....	7
3.1.7.2. Evolution naturelle de la maladie.....	7
3.1.7.3. Classification en stade clinique de l'infection Selon OMS 2013(21).....	8
3.2. Epidémiologie .....	10
3.3. Diversité génétique :.....	11
3.3.1. Conséquences de la diversité génétique .....	13
3.4. Répartition géographique .....	13
3.5. Diagnostique biologique au laboratoire .....	14
3.5.1. Diagnostic indirect ou sérologique(32) .....	14
3.5.2. Diagnostique directe(32) .....	15
3.5.3. Séquençage .....	15

3.5.3.1.	Séquençage de l'ADN :.....	15
3.5.3.2.	Les outils bioinformatiques d'analyse des séquences de l'ADN :.....	16
3.5.3.2.1.	Objet de la bioinformatique: .....	16
3.5.3.2.2.	Analyse des séquences :.....	16
3.6.	Traitement : .....	16
3.6.1.	Objectifs du traitement antirétroviral : .....	16
3.6.2.	Obstacles :.....	17
3.6.3.	Différentes classes thérapeutiques .....	17
3.6.4.	Stratégies de traitement antirétroviral :.....	21
3.6.5.	Echec thérapeutique :.....	23
3.6.5.1.	Echec virologique : .....	23
3.6.5.2.	Echec immunologique : .....	23
3.6.5.3.	Echec clinique :.....	23
3.6.6.	Observance : .....	23
3.6.7.	Résistance du VIH aux antirétroviraux : .....	23
3.6.7.1.	Définition :.....	24
3.6.7.2.	Mécanisme d'apparition des mutations de résistance :.....	24
3.6.7.3.	Mécanisme de la résistance aux antirétroviraux :.....	24
3.6.7.3.1.	Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :.....	24
3.6.7.3.2.	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) : .....	26
3.6.7.3.3.	Inhibiteurs de protéase (IP) :.....	26
3.6.7.3.4.	Les inhibiteurs d'entrée :.....	27
3.6.7.3.5.	Inhibiteurs d'intégrase (INI) : .....	28
3.6.7.4.	Les tests de résistance : .....	29
3.6.7.5.	Critères de demande de génotypage au Mali .....	29
4.	METHODOLOGIE.....	31
4.1.	Cadre et lieu d'étude : .....	31

4.2.	Type et période d'étude :.....	31
4.3.	Population d'étude :.....	32
4.4.	Critères d'inclusion :.....	32
4.5.	Critères de non inclusion :.....	32
4.6.	Définition des cas :.....	32
4.7.	Saisie et analyse des données .....	32
4.8.	Méthodes utilisées :.....	32
4.8.1.	La technique Viroseq®.....	33
4.8.1.1.	Principe de la technique :.....	33
4.8.1.2.	Organisation de la paillasse : .....	33
4.8.1.3.	Réactifs et matériels :.....	33
4.8.1.4.	Préparation des échantillons : .....	37
4.8.1.5.	Réaction de la RT-PCR :.....	37
4.8.1.6.	Réaction de la PCR : .....	38
4.8.1.7.	Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence :.....	39
4.8.1.8.	Réaction de séquence :.....	39
4.8.1.9.	Préparation des échantillons à charger dans le séquenceur : .....	40
4.8.1.10.	Détection des mutations et analyse des données :.....	40
4.8.2.	Technique de génotypage de résistance du VIH-1 selon les protocoles de l'ANRS.....	40
4.8.2.1.	Extraction de l'ARN du VIH-1 .....	40
4.8.2.1.1.	Préparation des réactifs(66). .....	40
4.8.2.1.1.1.	Ajout de RNA carrier-tampon AVE au tampon AVL.....	40
4.8.2.1.1.2.	Reconstitution du tampon AW1 .....	41
4.8.2.1.1.3.	Reconstitution du tampon AW2.....	41
4.8.2.2.	Procédure d'extraction .....	41
4.8.2.2.1.	Concentration de L'ARN .....	41
4.8.2.2.2.	Extraction de l'ARN .....	41

4.8.2.3. PCR à partir de l'ARN rétroviral extrait, migration, sur le gel d'agarose, purification, réaction de séquence, précipitation éthanolique, séquençage et analyses bioinformatiques.....	42
4.8.2.3.1. Reconstitution des oligonucléotides (amorces) .....	42
4.8.2.3.2. Amplification par PCR.....	42
4.8.2.3.2.1. Reverse transcription / Amplification (RT/PCR) ; Kit Titan (Roche) .....	42
4.8.2.3.2.2. Nested PCR (PCR nichée) Kit Expand High Fidelity (Roche).....	44
4.8.2.3.3. Migration sur le gel d'agarose .....	45
4.8.2.3.3.1. Préparation du tampon TBE 10X (pour 1 litre).....	45
4.8.2.3.3.2. Préparation du tampon TBE 1X (pour 1 litre).....	45
4.8.2.3.3.3. Préparation du gel d'Agarose (1%).....	45
4.8.2.3.3.4. Electrophorèse en gel d'agarose.....	45
4.8.2.3.4. Purification de l'ADN avec le kit QIAGEN .....	46
4.8.2.3.5. Réaction de séquence .....	46
4.8.2.3.6. Précipitation éthanolique.....	47
4.8.2.3.7. Electrophorèse capillaire.....	48
4.8.2.3.8. Analyses bioinformatiques.....	49
4.9. Considération éthique.....	49
5. RESULTATS .....	50
5.1. Les profils socio-démographiques des patients.....	50
5.2. Les profils immuno-virologiques des patients .....	51
5.3. La diversité génétique du VIH-1 des sous types chez nos patients.....	52
5.4. La durée du traitement de nos patients.....	52
5.5. Le nombre des molécules ARV exposées de nos patients .....	54
5.6. Les profils des mutations de résistance chez nos patients.....	56
5.7. Croisements statistiques des différents paramètres chez nos patients.....	59
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION : .....	61
6.1. Limites de notre étude :.....	61

6.2.	La technique utilisée :	61
6.3.	Données démographiques et biologiques :	61
6.4.	Diversité génétique et sous-type de VIH-1:	63
6.5.	Prévalence des mutations de résistance :	63
6.5.1.	Prévalence des mutations de résistance aux INTI :	63
6.5.2.	Prévalence de l'exposition par rapport à la résistance aux INTI.	64
6.5.3.	Prévalence des mutations de résistance aux INNTI :	64
6.5.4.	Prévalence de la résistance par rapport à l'exposition aux INNTI :	65
6.5.5.	Prévalence de la résistance aux IP :	65
6.5.6.	Croisement statistique de la résistance du VIH-1 aux ARV en fonction de la charge virale.	65
6.5.7.	Croisement statistique de la résistance du VIH-1 aux ARV en fonction de la durée du traitement.	65
7.	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS:	66
7.1.	Conclusion	66
7.2.	Recommandations :	67
8.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	69

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification en stade clinique de l'infection à VIH selon CDC (Centers for Disease Control) modifiée en 1993(21).....	10
Tableau II: liste des molécules ARV commercialisées(33). .....	20
Tableau III : Préparation de la PCR master-mix dans un microtube et dans de la glace. ....	38
Tableau IV : Programme utilisé sur le thermocycler. ....	39
Tableau V : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de RT/PCR de VIH-1 .....	43
Tableau VI: Conditions d'amplification de la première PCR pour le VIH-1 .....	43
Tableau VII : Composition du mélange réactionnel pour la réaction de Nested PCR pour le VIH-1 ...	44
Tableau VIII: Conditions d'amplification de la deuxième PCR pour le VIH-1 .....	44
Tableau IX : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de séquence des VIH-1.....	47
Tableau X : Conditions d'amplification pour la réaction de séquence de VIH-1 .....	47
Tableau XI: Répartition des patients en fonction de l'âge .....	50
Tableau XII : Répartition des patients selon le taux de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> à l'échec. ....	51
Tableau XIII : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique à l'échec. ....	51
Tableau XIV : Répartition des patients en fonction de la durée du traitement des ARV .....	52
Tableau XV : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des INTI .....	53
Tableau XVI : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des INNTI.....	53
Tableau XVII : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des IP .....	53
Tableau XVIII : Répartition des patients en fonction du nombre total des molécules exposées .....	54
Tableau XIX : Répartition des patients selon le nombre des molécules exposées de la famille des INTI .....	54
Tableau XX : Répartition des patients en fonction du nombre des molécules exposées de la famille des INNTI.....	55
Tableau XXI : Répartition des patients en fonction du nombre des molécules exposées de la famille des IP .....	55
Tableau XXII : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale plasmatique.....	59
Tableau XXIII : Croisement statistique de la résistance aux ARV selon la durée du traitement ARV .	60

## Liste des Figures

Figure 1: Structure morphologique du HIV(10).....	4
Figure 2 : Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1(11).....	5
Figure 3: Cycle répliatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4 <sup>+</sup> (16).....	6
Figure 4 : Evolution dans le temps des marqueurs biologiques lors d'une infection VIH(20).....	8
Figure 5: Arbre phylogénétique des VIH (28) .....	12
Figure 6: Distribution géographique des personnes vivant avec VIH dans le monde (31).....	14
Figure 7: Position des principales mutations de résistance aux IP(56). .....	27
Figure 8: Répartition des patients en fonction du sexe. ....	50
Figure 9 : Répartition des patients en fonction des sous-types du VIH-1.....	52
Figure 10 : Fréquence des mutations associées aux INTI.....	56
Figure 11 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI.....	56
Figure 12 : Fréquence des mutations associées aux INNTI. ....	57
Figure 13 : Fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux INNTI. ....	57
Figure 14 : Fréquence associée à la mutation aux IP. ....	58
Figure 15: Fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux IP. ....	58

## Liste des Abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ANRS** : Agence Nationale de Recherche sur le Sida

**ARCAD** : Association de Recherche de Communication et d'Accompagnement à Domicile des personnes vivant avec le VIH /Sida

**ARN**: Acide Ribonucléique

**ARV**: Antirétroviraux

**CCR5**: CC Chemokine Receptor 5 ou CC Récepteur de chemokine 5

**CDC**: Center for Disease Control and prevention

**CD4/CD8**: Cluster of Differentiation 4/8 ou caractère de differentiation 4/8

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

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CNTS** : Centre National de Transfusion Sanguine

**CRF**: Circulating Recombinant Form ou Forme recombiné circulant

**CS** : Centre de Santé

**CSLS** : Cellule Sectorielle de Lutte contre le Sida

**CXCR4** : CXC Chemokine Receptor ou CXC Récepteur de chemokine

**CV** : Charge Virale

**EDS V** : Enquête Démographique de Santé du Mali

**ELISA**: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ou dosage immuno-enzymatique

**Env** : Enveloppe

**FAPH** : Faculté de Pharmacie

**FMOS** : Faculté de Médecine et d'odontostomatologie

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Gag** : Group antigen ou Antigène de Groupe

**Gp** : Glycoprotéine

**ICER** : Centre International d'excellence en Recherche

**INI**: Integrase Inhibitor

**INNTI** : Inhibiteur Non-Nucléotidique/Nucléosidique de la Transcriptase Inverse

**INTI** : Inhibiteur Nucléotidique/Nucléosidique de la Transcriptase Inverse

**IMAARV** : Initiative Malienne d'Accès aux ARV

**IP** : Inhibiteur de la Protéase

**LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien

**NIAID**: National Institute of Allergy and Infectious Diseases ou Institut national des maladies Allergiques et infectieuses

**NIH**: National Institute of Health

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ONUSIDA** : Organisation des Nations Unis contre SIDA

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**Pol** : Polymérase

**PVVIH** : Personne Vivant avec le VIH

**RT-PCR**: Real Time Polymerase Chain Reaction

**SEREF0**: Centre de Recherche et de Formation sur le VIH/SIDA et la Tuberculose

**TAR** : Traitement Antirétroviral

**TDR** : Test de Dépistage Rapide

**TI/RT** : Transcriptase Inverse/Reverse transcriptor

**UCRC** : University Clinical Research Center

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**URF** : Unit Recombinant Form ou Unique forme recombinante

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

**VIH/SIDA** : Virus de l'Immunodéficience Humaine/Syndrome de l'Immunodéficience

Acquis

**WB** : Western Blot

## Liste des abréviations des ARV

**3TC : Lamuvidine**

**ABC : Abacavir**

**ATV : Atazanavir**

**AZT: Zidovudine**

**d4T: Stavudine**

**DDI: Didanosine**

**DRV: Darunavir**

**DTG: Dolutegravir**

**EFV : Efavirenz**

**ETV : Etravirine**

**Fos APV : Fosamprénavir**

**FTC : Emtricitabine**

**IDV: Indanavir**

**LPV/r : Lopinavir boosté par le Ritonavir**

**MRV : Maraviroc**

**NFV : Nelfinavir**

**NVP : Niverapine**

**RAL: Raltégravir**

**RPV: Rilpivirne**

**RTG: Raltégravir**

**SQV : Saquinavir**

**T20 : Enfuvirtide**

**TDF : Tenofovir**

**TPV : Tipranavir**

**A** : alanine ; **C** : cystéine ; **D** : aspartate ; **E** : glutamate ; **F** : phénylalanine ; **G** : glycine

**H** : histidine ; **I** : isoleucine ; **K** : lysine ; **L** : leucine ; **M** : méthionine ; **N** : asparagine

**P** : proline ; **Q** : glutamine ; **R** : arginine ; **S** : sérine ; **T** : thréonine ; **V** : valine ; **W** : tryptophane ; **Y** : tyrosine

## 1. INTRODUCTION

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) causant le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) reste toujours un problème mondial de santé publique. Plus de trente ans après sa découverte, il figure parmi les premières causes de morbidité et de mortalité dans le monde particulièrement en Afrique Subsaharienne(1).

Isolé à l'institut Pasteur de Paris par l'équipe de Luc Montagnier pour la première fois en 1983(2). Le VIH se transmet par les voies sexuelle et sanguine et Materno-foetale.

D'après le dernier rapport de l'Organisation des Nations Unis contre le SIDA (ONUSIDA) en 2017, l'épidémie mondiale d'infection à VIH s'est stabilisée en 2017, avec un nombre de cas de l'ordre de 36,7 millions [ 30,8 millions- 42,9 millions](3). Le nombre de nouveaux cas d'infection à VIH détecté chaque année et le nombre de décès lié au VIH /SIDA sont en baisses respectivement (1,8 millions et 1 million en 2017)(3). L'Afrique subsaharienne comptait 25,6 millions des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) soit 69,75% de la charge mondiale. L'Afrique subsaharienne a enregistré près de 2/3 d'infections sur les 1,8 millions de nouvelles infections recensées dans le monde en 2017 et 73% des décès liés au VIH sont survenus en Afrique Subsaharienne(1).

Au Mali, la cinquième enquête démographique et de santé (EDS M-V), réalisée en 2012 a montré une baisse du taux de prévalence de 1,3% à 1,1% faisant du Mali un pays à faible prévalence avec une tendance à la stabilisation(4).

Le VIH peut être supprimé par une trithérapie ARV consistant à associer 3 médicaments antirétroviraux (ARV) ou plus. Le TAR ne guérit pas l'infection à VIH, mais supprime la réplication virale dans l'organisme et permet au système immunitaire de se renforcer et de reconstituer sa capacité à combattre les infections(1).

Des progrès remarquables sont réalisés en matière de traitement du VIH. Jusqu'en juin 2017, environ 20,9 millions de personnes ont eu accès aux médicaments vitaux dans le monde(3). Afrique comptait 15,5 millions parmi les 20,9 millions de personnes qui ont eu accès aux médicaments vitaux dans le monde(5).

La gratuité de la prise en charge du VIH a considérablement élargi l'accès aux traitements ARV avec la recommandation d'une combinaison d'au moins trois molécules lancée en 2004 par l'IMAARV (Initiative Malienne d'Accès aux ARV).

A la date du 31 mars 2017 le Mali comptait 38878 patients séropositifs sous ARV (adultes et enfants) dont 36107 en première ligne (33548 adultes, 2559 enfants), 2738 en deuxième ligne (2408 adultes, 330 enfants), et 33 en troisième ligne tous adultes.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

L'extension du traitement antirétroviral (ART) se poursuit et constitue un élément important de l'objectif de développement durable (ODD) visant à mettre un terme et à inverser l'épidémie du sida dans les horizons 2030(1). Aussi le Mali a besoin d'atteindre les objectifs des trois 90 d'ici 2020 de l'ONUSIDA qui stipule que :

- ✓ 90% de toutes les personnes vivant avec le VIH connaissent leur sérologie.
- ✓ 90% de toutes les personnes séropositives reçoivent un TARV.
- ✓ Et 90% de toutes les personnes sous ARV doivent avoir une suppression virale(6).

Malgré l'efficacité, des traitements ARV des échecs virologiques, la résistance du VIH aux ARV peuvent survenir. Les principales causes de cette résistance du VIH sont : l'inobservance, la posologie insuffisante, les interactions médicamenteuses et l'effet antiviral insuffisant. Plus de 20 ans les patients étaient restés sous traitement ARV de 1<sup>ère</sup> ligne couplés à un manque de suivi virologique, un switch tardif en 2<sup>ème</sup> ligne, et une augmentation des échecs virologiques de 2<sup>ème</sup> ligne avec des prévalences respectives : 22% de résistance aux IP dans une étude menée en Afrique subsaharienne par Boender et al en 2016 et 8,6% des virus résistants aux trois classes de médicaments disponibles au Mali rapportés par Maiga et al en 2012(7,8). Le traitement de 2<sup>ème</sup> ligne est optimal. Tous ceux-ci pourraient compromettre l'attente du dernier 90 % de l'objectif de l'ONUSIDA d'ici 2020 en Afrique subsaharienne particulièrement au Mali.

Notre étude a pour objectif général d'évaluer la prévalence des profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de 2<sup>ème</sup> ligne.

**Hypothèse** : Un risque de résistance du traitement ARV qui sera élevé chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de 2<sup>ème</sup> ligne.

## **2. OBJECTIFS**

### **2.1. Objectif principal :**

- ✓ Evaluer la prévalence des profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne.

### **2.2. Objectifs spécifiques :**

- ✓ Décrire les profils sociodémographiques des patients.
- ✓ Décrire les profils immunovirologiques des patients au moment de la réalisation du test de résistance génotypique.
- ✓ Caractériser la diversité génétique des différents sous-types de VIH-1 circulant dans cette population.
- ✓ Décrire les profils de résistance aux traitements antirétroviraux.

### 3. Généralités

#### 3.1. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

##### 3.1.1. Historique de la découverte du VIH /Sida

C'est en 1981 que M. Gottlieb, à Los Angeles, est amené à observer une pneumonie à "*Pneumocystis carinii*" chez un sujet masculin jeune sans antécédents médicaux notables. La Pneumocystose était alors une maladie exceptionnelle rencontrée chez les grands Immunodéprimés iatrogéniques. Ce patient présentait un effondrement d'une population Lymphocytaire jouant un rôle majeur dans l'orchestration des défenses immunitaires : les Lymphocytes T porteurs des récepteurs CD4 (T CD4). En quelques semaines, d'autres cas de Pneumocystose parfois associés à un sarcome de Kaposi vont être répertoriés chez des hommes jeunes qui sont tous homosexuels. Cette pathologie nouvelle dite le « gay syndrome » va faire l'objet de publications et d'alerte. Le terme SIDA va alors être retenu pour cette infection (2).

##### 3.1.2. Définition et classification du VIH/Sida

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine responsable du syndrome d'Immunodéficience Acquise appartient à la famille des Retroviridae, c'est un virus à ARN monocaténaire, ayant une capsidie polyédrique, recouverte d'enveloppe membranaire. Les rétrovirus ont en commun le fait que leur génome doit être transcrit en ADN une transcriptase inverse (TI)(9).

##### 3.1.3. Structure et morphologie du VIH

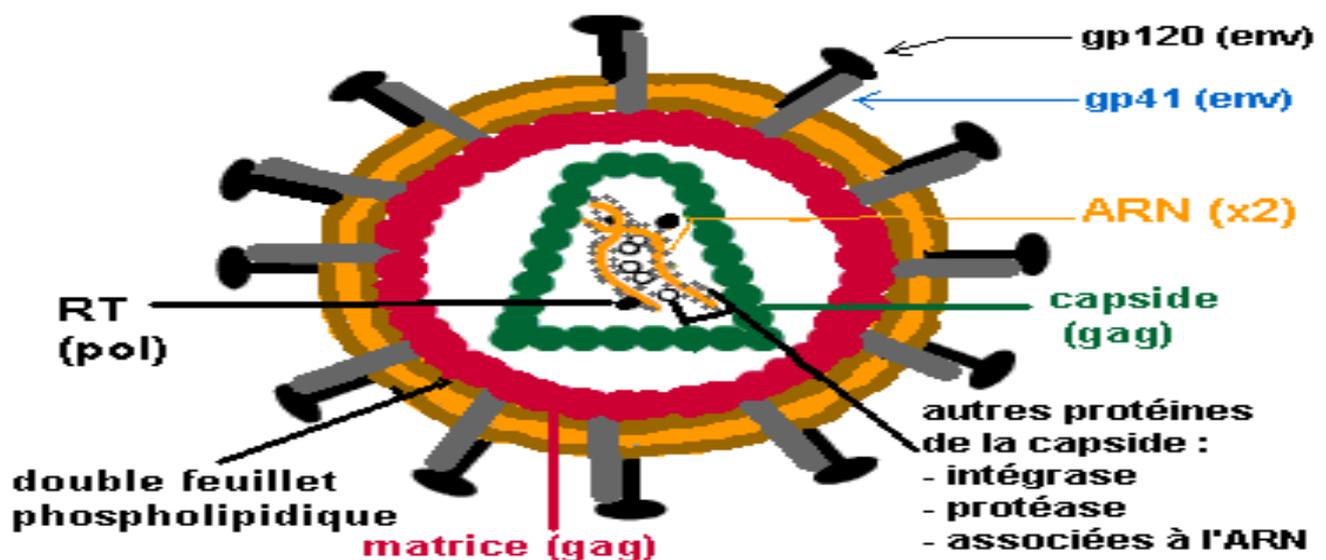
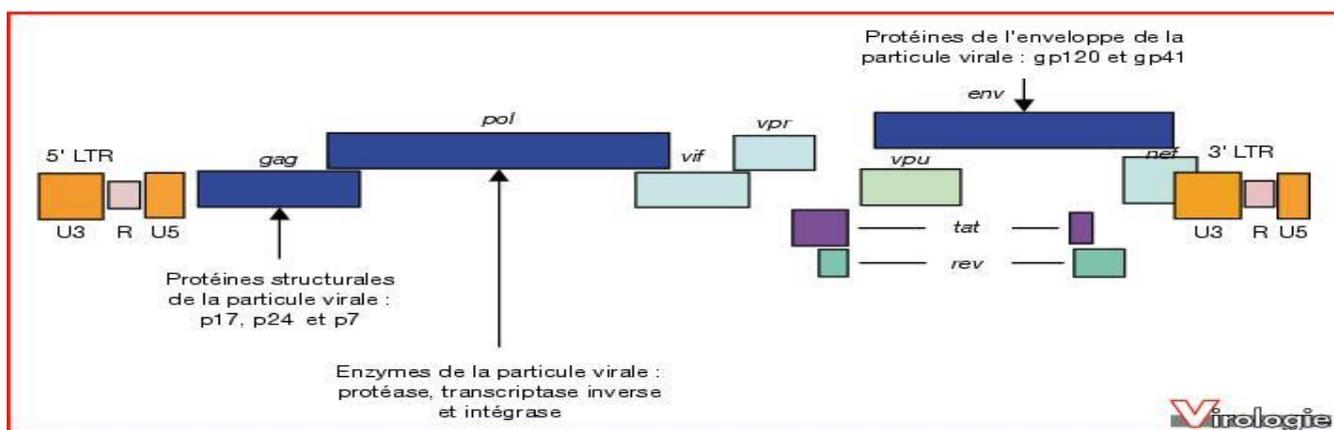


Figure 1: Structure morphologique du HIV(10).

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui contient à sa surface une protéine de fusion ainsi qu'une molécule servant à lier les récepteurs de la cellule cible.



**Figure 2 : Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1(11).**

Le génome du VIH-1 est présent en deux copies d'ARN identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux, gag, Pol, env, qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. Le gène gag mène à la production du précurseur Gag (Pr55) qui, suite à son clivage, produit la matrice (MA) (p17), la capsid (CA) (p24), la nucléocapsid (NC) (p7) et une petite protéine p6. Ces protéines structurales sont essentielles pour obtenir une particule virale complète. De son côté, le gène Pol code pour les enzymes telles que la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN) (intégration de l'ADN viral au génome cellulaire) et la protéase (maturation des particules virales). Finalement, le gène env, permet la production des protéines qui constituent l'enveloppe soient la glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41(12).

### 3.1.4. Stabilité physico-chimique

Le VIH étant un virus enveloppé, il est sensible aux solvants des lipides et aux détergents. Il ne résiste pas à la chaleur puisqu'il est inactivé à 56°C pendant 30 minutes et également par traitement pendant 5 minutes à l'hypochlorite de sodium à 0,2%, l'éthanol à 70 %, le glutaraldéhyde à 0,2 % (13).

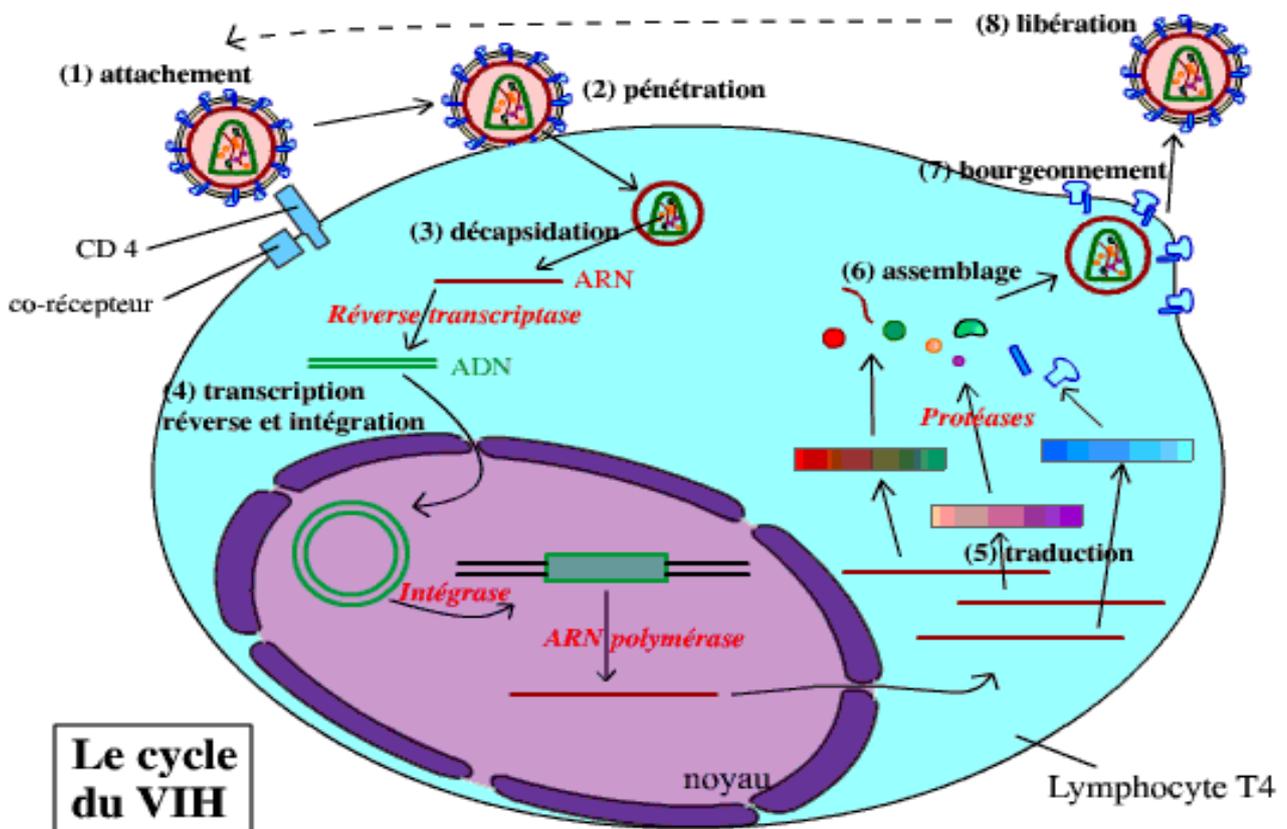
### 3.1.5. Cycle de réplication

Les cellules cibles du VIH sont celles présentant des récepteurs CD4 à leur surface. Ainsi les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules micro gliales cérébrales peuvent être infectées par le VIH. La réplication virale a lieu dans plusieurs tissus. La réplication du virus se déroule en Plusieurs étapes : Le virus entre en contact avec le récepteur CD4 via sa glycoprotéine gp120, qui va subir certaines modifications lui permettant de se fixer à un corécepteur

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

(CCR5 ou CXCR4). Cette fixation dévoile la gp41, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Il y a peu de temps, il était acquis que la transcription inverse de l'ARN viral n'avait lieu qu'après la décapsidation. Or, de récentes études ont montré que cette étape pouvait avoir lieu également dans la capside, présente dans le cytoplasme(14).

L'ARN génomique y est ainsi rétro-transcrit en ADN par la TI. L'ADN migre ensuite dans le noyau sous forme de complexe de pré-intégration pour être intégré dans le génome de la cellule hôte sous forme proviral grâce à l'intégrase. L'ADN proviral reste ensuite soit à l'état latent, soit est transcrit en ARN par la machinerie cellulaire. Les ARN produits sont destinés à plusieurs étapes: certains serviront de matériel génétique pour les nouveaux virions, d'autres seront traduits en poly protéines, en ayant subi une étape d'épissage au préalable ou non. Les poly protéines produites vont subir certaines modifications; la gp160 est clivée par une protéase cellulaire en gp120 et gp41, protéines qui vont ensuite migrer vers la membrane cellulaire. Les précurseurs gags et gag-pol vont ensuite être clivés par la protéase virale, qui se sera auto-clivée de gag-pol au préalable. Tous ces éléments vont ensuite se rapprocher de la membrane cellulaire pour être empaquetés. Le virion ainsi formé, après bourgeonnement, entre dans un processus de maturation grâce à la protéase pour aboutir à un virus mature dont la capside est définitivement assemblée(15).



**Figure 3:** Cycle réplcatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (16)

### **3.1.6. Cellules cibles et réservoir du virus**

Les cellules sensibles à l'infection par le VIH expriment le récepteur CD4 à la surface de leur membrane. Ce récepteur, découvert en 1984, s'avère insuffisant pour permettre l'entrée du virus. Dix ans plus tard, les récepteurs aux chimiokines, CXCR4 et CCR5 ont été désignés comme corécepteurs indispensables à l'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible. Parmi les cellules cibles, on retrouve principalement les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, mais également les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les cellules micro gliales du cerveau. La majorité des infections (99%) a lieu dans les cellules lymphocytaires activées CD4+ des organes lymphoïdes, réservoir principal du virus. En effet, il semble que le processus de pathogénicité du VIH soit initié précocement dans les organes lymphoïdes. De plus, une des particularités du VIH est sa persistance sous forme d'ADN proviral dans les cellules T4 mémoires. Certaines d'entre elles entrent en phase quiescente après infection et intégration du provirus; la réplication cellulaire, donc celle du provirus, est inhibée par un certain nombre de facteurs cellulaires, résultant en un ADN proviral silencieux dans la cellule, et ce jusqu'à plusieurs mois. Ce n'est que lors d'une stimulation immunitaire que les réplifications cellulaires et virales reprennent, aboutissant ainsi à la production de virions capables d'infecter de nouvelles cellules(17).

### **3.1.7. Mode de transmission et Evolution naturelle de la maladie**

#### **3.1.7.1. Mode de transmission**

Le virus est présent dans les liquides biologiques de l'organisme des personnes infectées. On le retrouve donc dans: le sang, le sperme, le liquide séminal, les sécrétions anales, les sécrétions vaginales et le lait maternel. Les trois principaux modes de transmission sont donc : la transmission par voie sexuelle, la Transmission par voie sanguine et la transmission verticale (mère/enfant)(18).

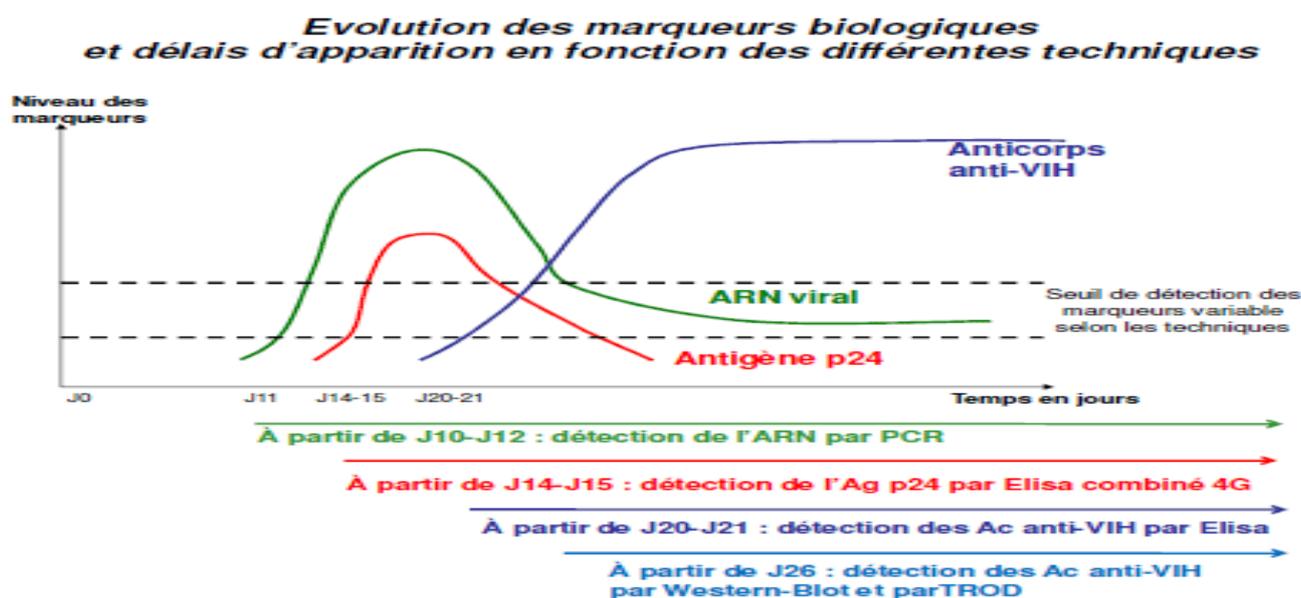
#### **3.1.7.2. Evolution naturelle de la maladie**

L'infection par le VIH conduit à la destruction progressive des lymphocytes T CD4+ par l'effet cytopathogène du virus et la cytotoxicité de la réponse immune. De façon naturelle, l'infection évolue en plusieurs phases.

La phase de primo-infection, symptomatique ou non, se caractérise par une forte réplication virale, ayant pour conséquence une destruction massive des lymphocytes T CD4+. Cette destruction peut être due soit à l'effet cytopathogène du virus, soit à la lyse induite par les lymphocytes T CD8+.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

La primo-infection est ensuite suivie par la mise en place de la réponse immunitaire spécifique, induisant ainsi une diminution de la charge virale. Pendant cette phase asymptomatique, dont le temps varie entre 8 et 12 ans, ont lieu simultanément la réplication virale et la destruction progressive du système immunitaire. Pendant plusieurs années, les lymphocytes T CD4+ sont rapidement renouvelés jusqu'à ce que l'altération des organes lymphoïdes centraux ne permette plus leur régénération. S'ensuit ainsi une phase pré-sida où le système immunitaire affaibli ne peut plus combattre les infections opportunistes qui émergent, avant d'aboutir à la phase sida. Les mesures de la charge virale (quantification de l'ARN VIH plasmatique) et du taux de CD4 sont des valeurs fortement corrélées à l'évolution de la maladie, et sont les outils de suivi d'un patient. Quant aux anticorps anti-VIH, dont la détection est encore utilisée pour le diagnostic d'une infection VIH, ils ne sont détectables qu'à partir du 21ème jour après l'infection, et l'Ag p24 dès le 14ème jour(19)



**Figure 4 :** Evolution dans le temps des marqueurs biologiques lors d'une infection VIH(20)

### 3.1.7.3. Classification en stade clinique de l'infection Selon OMS 2013(21)

**Stade clinique 1**, il est défini par :

Patient asymptomatique,

Adénopathies persistantes généralisées,

**Stade clinique 2**, défini par :

Perte de poids inférieure à 10 % du poids corporel,

Manifestations cutané muqueuses mineures (dermite séborrhéique, ulcération buccales récurrentes),

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Zona au cours des 5 dernières années, Infections récidivantes des voies respiratoires supérieures,

**Stade clinique 3**, défini par :

Perte de poids supérieure à 10 % du poids corporel,

Diarrhée chronique inexplicée pendant plus d'un mois,

Fièvre prolongée inexplicée pendant plus d'un mois,

Candidose buccale (muguet),

Leucoplasie chevelue buccale,

Tuberculose pulmonaire dans l'année précédente,

Infections bactériennes sévères (pneumopathies par exemple)

**Stade clinique 4**, défini par :

Pneumocystose

Toxoplasmose cérébrale

Maladie de Kaposi

Lymphome

Mycobactériose atypique généralisée, et plus généralement toute affection grave apparaissant chez un patient infecté par le VIH, ayant une baisse importante de son immunité (taux de CD4 inférieur à 200/mm<sup>3</sup>).

Cette classification de l'OMS est reprise par CDC en catégorie comme suit :

**Tableau I: Classification en stade clinique de l'infection à VIH selon CDC (Centers for Disease Control) modifiée en 1993(21)**

Nombre de lymphocytes TCD4+	(A) ou stade 1 OMS Asymptomatique Primo-infection Lymphadénopathie généralisée persistante	(B) ou stades 2/3 OMS Symptomatique sans critères (A) ou (C)	(C) ou stade 4 OMS Sida
≤ 350/mm <sup>3</sup>	A1	B1	C1
350-500/mm <sup>3</sup>	A2	B2	C2
> 500 /mm <sup>3</sup>	A3	B3	C3

### 3.2. Epidémiologie

Bien que l'infection à VIH demeure l'un des défis de santé les plus importants au monde, la solidarité internationale qui s'est mise en place au cours de la dernière décennie pour lutter contre ce fléau continue de générer d'extraordinaires progrès. Combinée à l'émergence de nouveaux outils efficaces conçus pour prévenir les nouvelles infections et les décès liés au sida, la réussite spectaculaire de l'élargissement et de l'intensification des programmes liés au VIH a permis de jeter les bases de l'éradication définitive de cette maladie. À l'échelle mondiale, 36,7 millions de personnes vivaient avec le VIH en 2017(3). L'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec 25,6 millions des cas de VIH ce qui représente 69,75% des personnes vivant avec le VIH dans le monde(1). À l'échelle mondiale, le nombre de nouvelles infections en 2017 avoisinait autour de 1,8 millions(3). 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. Globalement, les femmes sont les 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(4).

### **3.3. Diversité génétique :**

Celle-ci tient au processus même de multiplication de ces virus qui sont obligés de transformer leur ARN génomique en ADN pour s'intégrer dans la cellule hôte.

Dès 1985, une variabilité génétique importante des VIH a été mise en évidence; il n'existe pas deux virus identiques, même au sein d'un même individu. Cette diversité génétique, due à différents mécanismes (faible fiabilité de la TI, haut niveau de réplication, recombinaison génétique) peut avoir des conséquences sur la réponse aux traitements antirétroviraux.

Le VIH est divisé en deux "groupes", VIH-1 et VIH-2 qui proviennent de 2 événements de transmission inter-espèces différents, issus respectivement du Chimpanzé et du Sooty Mangabey. Les analyses phylogénétiques du VIH -1 à partir de différents isolats ont permis de le classer en 4 groupes génétiques M (main), O (outlier), N (non -M, non -O) et le dernier groupe P découvert récemment par l'équipe de Plantier(22).

La majorité des infections par le VIH est causée par le groupe M, les infections par les groupes N et O étant restreintes à l'Afrique centrale. Dans le groupe M, 9 sous-types sont reconnus et désignés par les lettres A-D, F-H J et K, les variations génétiques entre les sous-types allant de 25 à 30% selon les sous-types et les régions du génome considérées(23).

Il existe également des variations au sein d'un sous -type, entre 15 et 20%, tels que le sous-type F, divisé en sous sous-types 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. 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. Dans le cas contraire, ils sont appelés URFs (Unique Recombinant Forms), plus de 200 actuellement(24).

Tandis que neuf groupes VIH-2 ont été répertoriés à ce jour (de A à I), A et B représentant les deux groupes majoritaires(25)

A ce jour plus 90 CRFs ont été identifiés, les recombinants CRF01\_AE et CRF02\_AG jouant un rôle important dans les épidémies régionales(26). Récent, un nouveau recombinant VIH-2 a été découvert au Japon en 2010(27)

## Les différents groupes VIH-1 M, N, O, P infectant l'Homme

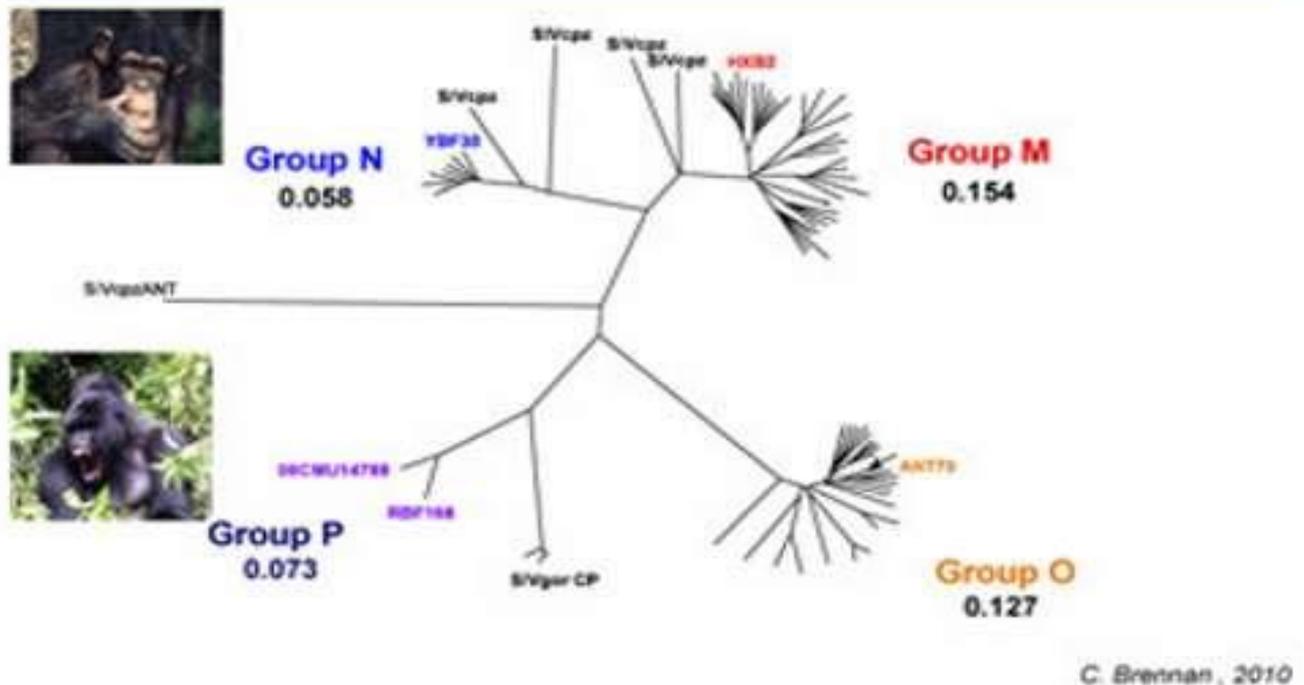


Figure 5: Arbre phylogénétique des VIH (28)

### Mécanismes de la diversité génétique

Ces mécanismes sont essentiellement dus à trois aspects :

- **Faible fiabilité de la transcriptase inverse** : Qui est incapable de corriger les mésappariements introduits lors de la polymérisation de l'ADN proviral et commet un taux d'erreur d'environ un par cycle, soit une erreur introduite par cycle.
- **Grande capacité de réplication** : Le haut niveau de la réplication du VIH (estimé à  $10^9 - 10^{10}$  virions produits par jours chez un individu infecté) induit une variabilité de la population virale au sein même de l'individu appelé quasi-espèce, à cause de la faible fiabilité de la TI.
- **Recombinaison génétique** :

La production de virus recombinants nécessite deux cycles viraux successifs. Lors du premier cycle viral, deux virus différents infectent une même personne simultanément ou non. Il en résulte une cellule hébergeant deux provirus au sein de son génome. En effet le génome du VIH étant composé d'un ARN dimérique, la TI a la capacité de passer d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la transcription inverse, créant ainsi un ADN proviral chimérique.

### **3.3.1. Conséquences de la diversité génétique**

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de la réplication couplé à une faible fiabilité de la TI et au phénomène de recombinaison génétique, elle est due à différents mécanismes, et a des impacts multiples sur le diagnostic (sérologique, charge virale) et notamment sur la réponse au traitement antirétroviral. Les tests de dépistage, reposant sur des antigènes du VIH-1 du sous-type B prévalent en occident et qui peuvent avoir une sensibilité moindre vis-à-vis des autres sous-types de groupe M appelé non B.

- Certaines études laissent entendre que la résistance aux ARV varierait selon les sous-types : par exemple, le groupe O du VIH-1 pourrait présenter une sensibilité moindre aux INNTI.
- Ainsi des études ont montré que plus de 50% des virus non B infectant des patients naïfs portent au moins trois mutations mineures de résistances aux IP, alors qu'elle n'est que 8% pour le B. La question de la sensibilité aux ARV, et particulièrement aux inhibiteurs de protéase des souches présentant un grand polymorphisme génétique reste posée.
- La diversité génétique du VIH constitue un obstacle à la mise au point de vaccins efficaces. En effet, la majorité des candidats vaccins, faisant actuellement l'objet d'essais cliniques ont été créés au moyen de souches de VIH-1 de sous-type B (prédominant en Amérique du Nord et en Europe). Cependant, on ignore jusqu'à quel point ces vaccins pourraient conférer une protection croisée entre les autres sous-types, notamment ceux prédominant en Afrique.
- La recombinaison entre différents types et sous-types peut induire des conséquences génétiques et biologiques de loin plus importantes que celle résultant de l'accumulation stable d'une simple mutation au sein d'un type ou d'un sous-type unique.
- La sélection des mutations à l'échec, les profils d'échappement peuvent également être différent selon le sous type de VIH-1. En effet, certaines mutations spécifiques aux sous-types peuvent être sélectionnées lors du traitement, par exemple le sous-type C, qui présente de nombreuses spécificités(29)

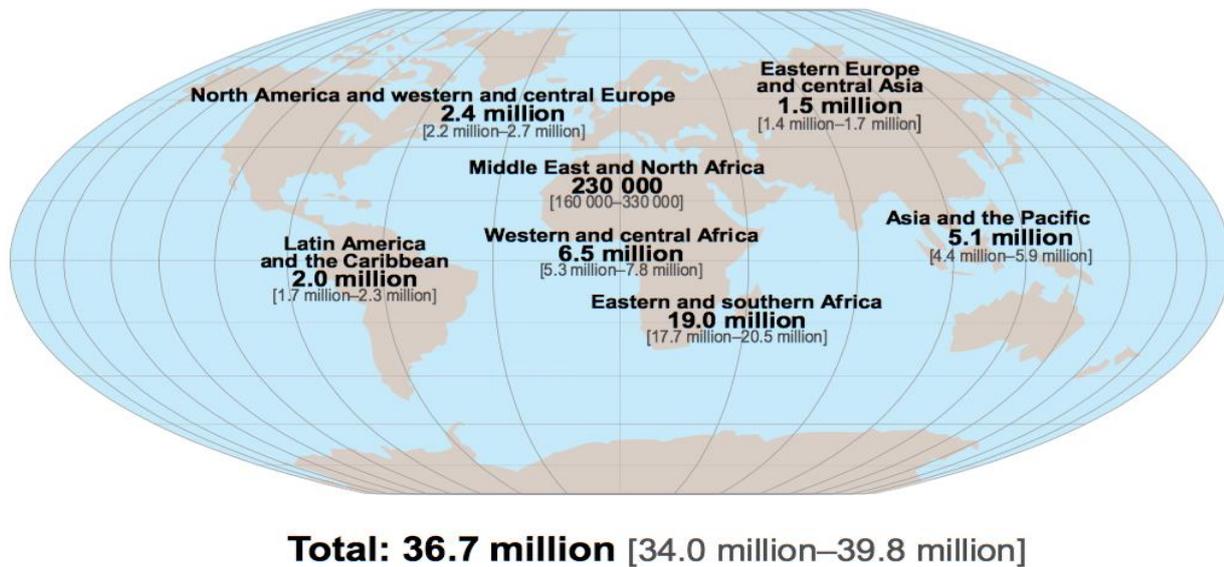
### **3.4. Répartition géographique**

Le VIH est très répandu au niveau mondial, les VIH-1 de sous types non B représentent au moins 90% des virus circulants. Les sous types prédominants sont le sous type C, responsable de 50 % des infections, principalement en Afrique de l'Est, en Asie, le sous type A et le D en Afrique de l'Est, le sous type CRF02\_AG en Afrique de l'ouest et le sous type B aux Etats-Unis, en Europe et en Australie(30)

En Afrique centrale, circulent les différents groupes du VIH-1 (M, N et O), l'ensemble des sous-types du groupe M et la majorité des formes recombinantes.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Des études récentes ont démontré qu'en France, des sous types non B circulent, et que la moitié de ces virus isolés sont des virus CRF02\_AG, ce qui témoigne des liens existant entre la France et l'Afrique de l'Ouest. Le VIH-2 a une diffusion beaucoup plus limitée, et est essentiellement présent en Afrique de l'Ouest, en particulier en Guinée-Bissau, Gambie, Sénégal, Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Mali. Il a atteint le Mozambique et l'Angola, à partir de la Guinée-Bissau et hors d'Afrique la France, l'Inde, le Portugal et le Brésil(30)



**Figure 6:** Distribution géographique des personnes vivant avec VIH dans le monde (31)

### 3.5. Diagnostic biologique au laboratoire

Le diagnostic de l'infection VIH est fondé sur une méthode sérologique indirecte c'est-à-dire sur la détection des anticorps, et reste dans la majorité des cas l'approche diagnostic la plus pertinente et la plus accessible. La mise en évidence du virus par la méthode directe se fait par extraction et RT-PCR de l'ARN viral plasmatique.

#### 3.5.1. Diagnostic indirect ou sérologique(32)

##### ➤ Dépistage

Les tests de dépistage de l'infection par les VIH reposent, d'une part, sur la mise en évidence des anticorps anti-VIH-1 et -2 par méthode immuno-enzymatique de type ELISA ou par test rapide (pour la plupart), et, d'autre part, sur la mise en évidence couplée des anticorps anti-VIH-1 et -2 et l'antigène p24 du VIH-1 grâce aux trousse ELISA dites « combinées ». Si le sérum et le plasma restent les

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

liquides biologiques utilisés en priorité pour des questions de qualité, d'autres matrices biologiques telles que le sang total capillaire, les urines ou la salive ont été proposées.

Au Mali, la dernière recommandation du ministère en charge de la santé au travers de la cellule du comité sectoriel de lutte contre le sida préconise l'utilisation du **Determine HIV** puis le **SD Bioline HIV** en cas de positivité du premier et le **First Response HIV** en cas de discordance entre les deux premiers.

#### ➤ **Confirmation**

La technique de référence utilisée des tests sérologiques de confirmation est le Western-blot, où les protéines virales sont séparées par électrophorèse avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. La présence d'anticorps contre une protéine donnée est révélée par une réaction immuno-enzymatique qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. Des tests comparables au western-blot, fabriqués à partir de protéines recombinantes et de peptides de synthèse déposés en bandes séparées sur un support, sont agréés comme réactifs de confirmation. Leur sensibilité est un peu supérieur à celle des Western-blot mais des informations qu'ils apportent sont moins fines(32).

#### **3.5.2. Diagnostique directe(32)**

Il repose sur plusieurs techniques toutes réalisées à partir d'un simple prélèvement sanguin qu'il convient de répéter. La PCR-RNA plasmatique met en évidence le génome du virus dans le plasma par RT-PCR. C'est la « charge virale », réalisée également dans le suivi des adultes infectés. Le DNA Proviral recherche le provirus intégré dans les cellules mononuclées réceptives (CD4 essentiellement). A Nice, le laboratoire de virologie effectue, sur le même prélèvement, une PCR-RNA plasmatique et une recherche quantitative de DNA proviral (par PCR quantitative. en temps réel). La conjugaison des deux techniques augmente la sensibilité.

#### **3.5.3. Séquençage**

##### **3.5.3.1. Séquençage de l'ADN :**

###### ✓ **Principe :**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés di désoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérase après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité de ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'.

Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic de certaines maladies héréditaires mais, reste néanmoins coûteuse et réservée à certains gènes en nombre limités et de petites tailles(33).

### **3.5.3.2. Les outils bioinformatiques d'analyse des séquences de l'ADN :**

#### **3.5.3.2.1. Objet de la bioinformatique:**

Elle consiste en l'ensemble des méthodes et programmes pour gérer, organiser, comparer, analyser, explorer, l'information génique et génomique stockée dans les bases de données dans le but de prédire et produire de nouvelles connaissances et de développer aussi de nouveaux concepts (34)

#### **3.5.3.2.2. Analyse des séquences :**

L'analyse bioinformatique fondamentale et principale réalisée sur les séquences d'ADN est l'alignement. Il s'agit de comparer des séquences grâce à des algorithmes.

### **3.6. Traitement :**

Les antirétroviraux sont des molécules virostatiques de synthèses de différentes natures chimiques regroupées en trois grandes classes selon leur mode d'action : les INTIs, les INNTIs et les IPs. Une quatrième classe d'inhibiteurs de la fusion est actuellement en cours de développement.

En 1996 arrive le concept de trithérapie, avec la disponibilité de nouvelles molécules antirétrovirales telles que les inhibiteurs de la protéase, montrant une réduction significative de la mortalité liée au SIDA. En effet, l'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes T CD4+; il doit rendre la charge virale plasmatique indétectable permettant une meilleure restauration du système immunitaire(9).

#### **3.6.1. Objectifs du traitement antirétroviral :**

Le traitement de l'infection à VIH a pour objectif la réduction maximale de la réplication virale (charge virale plasmatique < 50 copies/ml permettant d'empêcher la progression vers le SIDA et de restaurer un nombre de lymphocytes CD4 > 500/mm<sup>3</sup>), garant principal de la durabilité de l'effet antirétroviral, de la restauration des fonctions immunitaires et de l'absence de développement de la résistance du virus en présence de médicaments antirétroviraux. Si l'efficacité immunovirologique du traitement est essentielle, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément:

- La meilleure tolérance possible, à court, moyen et long terme ;
- L'amélioration ou la préservation de la qualité de vie
- La réduction de la transmission mère-enfant du VIH.

### 3.6.2. Obstacles :

Les avancées thérapeutiques ne doivent cependant pas laisser place aux triomphalismes car, les raisons suivantes peuvent constituer des obstacles :

- une minorité de patients infectés par le VIH dans le monde entier a accès aux antirétroviraux.
- les difficultés d'accès aux soins (précarité sociale, désorganisation des structures sanitaires, contexte psychologique...), concernent un nombre significatif de patients,
- les phénomènes de résistance acquise aux antirétroviraux actuellement disponibles surviennent chez un nombre croissant de patients,
- les complications métaboliques (syndrome lypodystrophique, anomalies glucidolipidiques) laissent présager une incidence accrue de complications vasculaires à moyen ou à long terme.
- L'observance chez l'enfant pose des difficultés particulières. Elle peut être influencée par de nombreux facteurs : le choix limite des formulations pédiatriques ; le mauvais goût des formulations liquides ; le grand nombre de comprimés ou la grande quantité de sirop à prendre ; la grosseur des comprimés ; la nécessité de prises médicamenteuses fréquentes ; les restrictions alimentaires ; la perte de la personne principale s'occupant de l'enfant ; les difficultés à avaler les comprimés ; et les effets indésirables.

### 3.6.3. Différentes classes thérapeutiques

Appartenant à six classes d'ARV, plus d'une vingtaine (20) de molécules sont disponibles de nos jours.

- **Les inhibiteurs de la transcriptase inverse**
  - ✓ **Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (INTI)**

Les INTI (ou NRTI pour nucléoside reverse transcriptase inhibitor) sont des pros médicaments qui doivent être tri phosphorylés dans la cellule pour être actifs. Ils subissent une activation en nucléoside triphosphate par les kinases cellulaires. Les formes triphosphates (et di phosphate pour le Tenofovir) possèdent une forte affinité pour la transcriptase inverse du virus VIH-1 et entrent en compétition avec les désoxynucléosides triphosphates naturels. Ils sont donc incorporés préférentiellement dans la chaîne de l'ADN en croissance causant une terminaison précoce de celle-ci (En raison du manque 3'-hydroxyl pour former le lien phosphodiester entre nucléotides). Le groupe OH 3' libre est nécessaire pour former une liaison avec le prochain nucléotide de la chaîne nucléotide en formation. Une fois phosphorylée, ces analogues trompent la transcriptase inverse en la faisant incorporer dans la chaîne de nucléotides en formation où ils servent de terminateur de chaîne(35).

✓ **Les inhibiteurs non nucléosidiques de la Transcriptase inverse (INNTI) :**

Ce sont des composés de structure chimique complètement différente de celles des nucléosides normaux. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs allostériques. Les INNTI occupent une poche hydrophobe voisine du site ADN-polymérase. Leur complexation modifie la géométrie de l'enzyme, ce qui diminue considérablement son efficacité catalytique.

Cela provoque un changement de conformation du site actif en déplaçant les résidus d'aspartate catalytiques (en relation avec le site de liaison) de la polymérase de telle façon qu'il ne peut plus se lier à un substrat nucléotide, rendant ainsi l'enzyme inactif(36). Contrairement aux INTI, les INNTI n'ont pas besoin d'une activation cellulaire puisqu'ils n'ont pas besoin de phosphorylation pour être actifs. Par conséquent, ces molécules ont un potentiel plus élevé que les INTI et inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 de façon irréversible mais pas celle du VIH-1 de groupe O et du VIH-2.

✓ **Les inhibiteurs de la protéase (IP)**

Les inhibiteurs de la protéase (IP ou PI pour protéase inhibitor) bloquent la phase tardive de la maturation virale. La protéase du VIH clive les polypeptides précurseurs, produits des gènes gag et pol codant les protéines de structure et les enzymes du virion. Métabolisés par le cytochrome P450, les IP sont l'objet d'interactions avec d'autres médicaments utilisant les mêmes voies métaboliques. Certains de ces autres médicaments sont contre-indiqués avec les IP, d'autres imposent des ajustements de doses. Les associations de deux IP et d'INNTI peuvent également nécessiter de tels ajustements. L'utilisation des IP est associée, à des degrés divers à une redistribution des graisses, à des troubles de la glycorégulation et à des hyperlipidémies(36).

✓ **Les inhibiteurs d'entrée**

Les inhibiteurs d'entrée ont plusieurs avantages sur les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase principalement parce qu'ils agissent de façon extracellulaire. Par conséquent, ils n'ont pas besoin de traverser la membrane cellulaire, ni besoin d'une activation intracellulaire.

▪ **Les inhibiteurs d'attachement**

Après la fixation du VIH sur le récepteur CD4, des interactions ont lieu entre le virus et des corécepteurs protéiques, faisant partie de la famille de chimiokines, en particulier le CCR5 et le CXCR4(37).

▪ **Les inhibiteurs de fusion**

Le seul inhibiteur de fusion actuellement disponible est un polypeptide, devant donc être injecté. Les inhibiteurs de fusion empêchent le changement de conformation de gp41 qui mènerait à la fusion des membranes du virus et de la cellule-hôte. En fait, ils seraient liés à la gp41 sous sa conformation de « repos » et l'empêcherait ainsi d'adopter une conformation en épingle à cheveux favorable à la fusion(38).

✓ **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. Les inhibiteurs de l'intégrase constituent une nouvelle classe d'agents antirétroviraux qui bloquent l'activité de l'intégrase du VIH-1(39). 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.

✓ **Autres molécules ARVs en voie de développement :**

**Bictegravir** : un nouvel inhibiteur de l'intégrase qui est en voie de développement pour le traitement des personnes vivant avec le VIH. Il agit contre de nombreuses souches du VIH qui sont résistantes à d'autres inhibiteurs de l'intégrase comme le Raltégravir. Il sera offert sous de Co-formulation avec le TAF et FTC(40).

**Doravirine** : est un analogue non nucléosidique expérimental qui est aux essais cliniques de phase III. Elle a été conçue pour agir contre la plupart des souches du VIH qui sont résistantes aux autres analogues non nucléosidiques tels les suivants : Efavirenz, Névirapine, Rilpivirine(41)

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Tableau II:** liste des molécules ARV commercialisées(33).

Dénomination Commune Internationale (DCI)	Abréviation	Nom commercial	Autorisation de mise sur le marché
<b>Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse</b>			
Zidovudine	AZT	Retrovir <sup>R</sup>	1987
Lamivudine	3TC	Epivir <sup>R</sup>	1996
Didanosine	ddI	Videx <sup>R</sup>	1992
Abacavir	ABC	Ziagen <sup>R</sup>	1999
Emtricitabine	FTC	Emtriva	2003
<b>Inhibiteur Nucléotidique de la Transcriptase Inverse</b>			
Tenofovir	TDF	Viread <sup>R</sup>	2002
Tenofovir Alafenamide Fumarate	TAF	Vemlidy <sup>R</sup>	2016
<b>Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse</b>			
Nevirapine	NPV	Viramune <sup>R</sup>	1998
Efavirenz	EPV	Sustiva <sup>R</sup>	1999
Etravirine	ETV	Entelence <sup>R</sup>	2008
Rilpivirine	RPV	Eduvant <sup>R</sup>	2011
<b>Combinaisons d'Inhibiteurs de la Transcriptase Inverse</b>			
Zidovudine/ Lamivudine	AZT/3TC	Combivir <sup>R</sup>	1998
Tenofovir/Emtricitabine	TDF/FTC	Truvada <sup>R</sup>	2005
Abacavir/Lamivudine	ABC/3TC	Kivexa <sup>R</sup>	2004
Zidovudine/Lamivudine /Abacavir	AZT/3TC/ABC	Trivizir <sup>R</sup>	2000
Tenofovir/Emtricitabine/Efavirenz	TDF/FTC/EFV	Atripla <sup>R</sup>	2007
Emtricitabine/Rilpivirine/Tenofovir	FTC/RPV/TDF	Eviplera <sup>R</sup>	2011
<b>Inhibiteurs de la Protéase</b>			
Ritonavir	RTV	Norvir <sup>R</sup>	1996
Fosamprenavir	FAPV	Telzir <sup>R</sup>	2004
Atazanavir	ATV	Reyataz <sup>R</sup>	2004
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra <sup>R</sup>	2001

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Darunavir	DRV	Prezista <sup>R</sup>	2008
Inhibiteurs d'Entrée			
Enfuvirtide	T20	Fuzeon <sup>R</sup>	2003
Maraviroc	MRV	Celsentri <sup>R</sup>	2008
Inhibiteurs d'Intégrase			
Raltegravir	RAL	Isentress <sup>R</sup>	2008
Elvitegravir	EVG	Vitekta <sup>R</sup>	2012
Dolutegravir	DTG	Tivicay <sup>R</sup>	2014
Cabotegravir	CTG	GSK744 <sup>R</sup>	Pas
Autres associations fixes			
Dolutégravir/Abacavir/Lamivudine	DTG/ABC/3TC	Truimeq <sup>R</sup>	2014
Elvitégravir/Emtricitabine/Tenofovir alafenamide /Cobicistat	EVG/FTC/TAF/COBI/	Genvoya <sup>R</sup>	2015
Elvitégravir/Cobicistat/Emtricitabine/ Fumarate de Tenofovir	EVG/COBI/FTC/TAF	Stribild <sup>R</sup>	2013

#### 3.6.4. Stratégies de traitement antirétroviral :

En l'absence de vaccin anti-VIH, le traitement antirétroviral comme outil de prévention de la transmission est une évolution récente et majeure, avec plusieurs études qui démontrent le rôle bénéfique des ARV non plus seulement au niveau de la santé de l'individu mais aussi dans la réduction drastique de la contagiosité lorsque la charge virale plasmatique est contrôlée sous traitement(42).

Ainsi l'OMS recommande en 2015«Toute personne infectée par le VIH devrait commencer le traitement antirétroviral le plus tôt possible après le diagnostic». Avec cette recommandation de «traiter tout le monde», l'OMS supprime toutes les limitations aux conditions requises pour pouvoir bénéficier du traitement antirétroviral quand on est porteur du VIH; le traitement est désormais justifié dans toutes les populations et dans toutes les tranches d'âge(43).

#### Schémas thérapeutiques

Est considéré comme schéma de première ligne tout schéma de première intention prescrit chez un sujet naïf de tout traitement antirétroviral. Toute substitution en cas d'intolérance par exemple est aussi considérée comme un schéma alternatif de première ligne. Est considéré comme schéma de deuxième ligne tout schéma prescrit après échec thérapeutique de 1<sup>ère</sup> ligne(44).

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Le schéma thérapeutique préconisé 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 et de combinaisons de thérapie antirétrovirale de dose fixe.

Au Mali, les régimes préférentiels en première intention ou schéma de 1 ère ligne et en deuxième intention ou schéma de 2ème ligne chez l'adulte et l'adolescent sont les suivants(44):

### Schémas de 1 ère ligne pour le VIH- 1

Le régime préférentiel de la première ligne(44) :

Il associe deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (**INTI**) et un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (**INNTI**).

**Tenofovir (TDF) +Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)**

Les régimes alternatifs suivants sont possibles :

**Zidovudine (ZDV, AZT) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)**

**Zidovudine (ZDV, AZT) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)**

**Ténofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)**

**Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV).**

### Schémas de 2ème ligne suivant proposé(44)

Schéma 1ère ligne	Schéma 2eme ligne	
	INTI	IP
<b>TDF +3TC +EFV</b>	<b>AZT+3TC</b>	<b>LPV/r</b> <b>ou</b> <b>ATV/r</b>
<b>AZT + 3TC + EFV</b>	<b>TDF + 3TC</b>	
<b>ABC+ 3TC + EFV</b>	<b>TDF + 3TC</b> <b>AZT+ 3TC</b>	

Pour Prise en charge des patients infectés par le VIH-2 ou co-infection VIH-1 et VIH-2 (ou patients infectés par le VIH-1 du groupe O), le choix thérapeutique doit exclure les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse qui ne sont pas efficaces sur le VIH-2 ou sur le VIH-1 de groupe O.

On utilisera les schémas thérapeutiques associant des inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse à un inhibiteur de protéase boosté (IP/r) ou **3 INTI** (44).

Le traitement préférentiel de première ligne est le suivant : (44)

**Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Lopinavir / Ritonavir (LPV/r)**

Les alternatives thérapeutiques en cas de toxicité, d'intolérance ou d'interaction médicamenteuse sont les suivantes:

**Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + ATV/r ou**

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + ATV/r ou  
Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Abacavir (ABC)**

**Schémas de 3ème ligne recommandée :**

Les patients en échec virologique de 2ème ligne doivent être gérés en fonction du résultat du test de génotype de résistance, si absence du génotypage, le staff proposerait(44).

**Darunavir/r (DRV/r)+ 1INTI sensible (3TC) + Raltégravir (RAL) ou Dolutégravir(DTG)**

**3.6.5. Echec thérapeutique :**

L'échec thérapeutique regroupe différentes situations.

**3.6.5.1. Echec virologique :**

L'échec virologique constitue la situation la plus fréquemment rencontrée. Il se définit comme la persistance d'une CV > 50 copies/ml au-delà de 6 mois après l'instauration du traitement(45).

**Le rebond virologique** se définit comme une CV > 50 copies/ml après une période de succès virologique, confirmé sur deux prélèvements consécutifs (45).

Au Mali, **l'échec virologique** est défini comme étant une charge virale supérieure ou égale à 1000 copies/ml sur la base de deux charges virales consécutives à 3 mois d'intervalle après 6 mois de traitement bien conduit(44).

**3.6.5.2. Echec immunologique :**

Il est défini chez les adultes et les adolescents le taux de LTCD4 inférieur à 250 cellules/mm<sup>3</sup> après un échec clinique documenté ou un taux de LTCD4 en dessous de 100 cellules/mm<sup>3</sup> après 6 mois de traitement bien conduit(44).

**3.6.5.3. Echec clinique :**

Il se caractérise par la survenue ou la récurrence d'une affection témoin d'une immunodépression sévère après 6 mois de traitement bien conduit(44). Habituellement, ce stade d'échec clinique est la conséquence d'un échec virologique et immunologique.

**3.6.6. Observance :**

Compte tenu de la puissance antirétrovirale des traitements actuellement utilisés en initiation, l'absence de réduction de la charge virale d'au moins 1log 10, 1 mois après l'initiation du traitement, ou une charge virale toujours > 200 copies/ml à 6 mois rendent presque toujours compte d'une observance médiocre au traitement

**3.6.7. Résistance du VIH aux antirétroviraux :**

La résistance aux antirétroviraux a été rapportée pour la première fois en 1989 chez des patients traités par la zidovudine en monothérapie(46).

### **3.6.7.1. Définition :**

La résistance aux antirétroviraux est liée à la capacité du virus à se répliquer en présence d'ARV. On distingue 03 types de résistance ; la résistance acquise sous traitement (résistance secondaire), la résistance primaire et la résistance naturelle (manque de sensibilité).

En effet, pour cette dernière, les patients porteurs de virus résistants peuvent transmettre ces virus à leurs partenaires qui vont alors s'infecter d'emblée avec des virus résistants lors de la primo-infection.

### **3.6.7.2. Mécanisme d'apparition des mutations de résistance :**

Les mutations entraînent des modifications des enzymes ou protéines, en diminuant la sensibilité des virus aux antirétroviraux par des mécanismes différents selon les classes et même selon l'antirétroviral dans une même classe(47).

Ces mécanismes peuvent être dus :

- ✓ à la dynamique de production virale très rapide, environ 10 milliards de virions sont produits chaque jour chez une personne infectée.
- ✓ à la variabilité génétique importante du VIH,
- ✓ à la préexistence, avant tout traitement, de variant viral présentant des mutations de résistance aux ARV, qui peuvent s'accumuler.

### **3.6.7.3. Mécanisme de la résistance aux antirétroviraux :**

Différents mécanismes de résistances ont été identifiés en fonction des classes d'antirétroviraux et même selon les antirétroviraux au sein d'une même classe.

#### **3.6.7.3.1. Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :**

Deux mécanismes moléculaires distincts sont responsables de la résistance aux analogues nucléosidiques :

- **Diminution de l'incorporation de l'analogue(48) :**

La diminution de l'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels est observée avec certaines mutations, et en particulier la mutation M184V associée à une résistance de haut niveau au 3TC (Lamivudine) et au FTC. Ce résidu est localisé au niveau du site catalytique de la transcriptase inverse. L'apparition de la résistance au 3TC/FTC est rapide avec la sélection de la mutation M184V en quelques semaines.

Ce mécanisme de résistance est également caractéristique des mutations K65R, K70E et L74V :

- La mutation L74V est sélectionnée par la didanosine et l'abacavir (en association fréquente avec la M184V) et les mutations K65R et K70E principalement par le ténofovir ;
- L'impact de la mutation K65R est nul sur les analogues de la thymidine (la zidovudine est l'INTI de choix en présence de K65R), certain sur le ténofovir probable sur l'abacavir (avec des niveaux

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

variables). L'utilisation de ténofovir en association avec l'abacavir doit être réservée aux patients en échec dont les virus présentent des mutations TAMs. En effet, ces dernières empêchent la sélection de la mutation K65R. Le complexe MDR (Mutation Drug Resistance), relevant de ce même mécanisme, est composé des mutations A62V, V75I, F77L, F116Y et Q151M.

Un autre profil de résistance à l'ensemble des analogues nucléosidiques et au ténofovir consiste en des insertions au codon 69 de la transcriptase inverse.

Ce complexe comprend une mutation au codon 69, typiquement une sérine, et une insertion d'acides aminés (S-S, SA, S-G ou autre).

Ces insertions au codon 69 sont souvent associées à d'autres mutations sur le gène de la transcriptase inverse. La fréquence de ces insertions est heureusement rare (48).

- **Excision des analogues médiée par l'ATP ou réaction de pyrophosphorolyse :**

Ce mécanisme intervenant dans la résistance aux INTI est conféré à un groupe de six mutations : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. ces mutations, initialement décrites comme des mutations de résistances sélectionnées par la zidovudine puis également par la Stavudine, affectant la réponse virologique à ces molécules, ont été appelées TAM pour Thymidine Analogue Mutations(49,50). L'accumulation des TAM est graduelle et l'ordre d'apparition peut varier. Les profils de TAM sélectionnés sous traitement peuvent se répartir en deux groupes : l'un comprenant les mutations M41L + L210W + T215Y (deux tiers des cas) et l'autre D67N + K70R + T215F + K219Q/E (un tiers des cas).

En effet, les TAM modifient la structure de la transcriptase inverse, facilitant l'entrée de l'ATP au niveau d'un site proche de l'analogue incorporé à l'ADN. Le phosphate terminal de l'ATP réagit avec la liaison phosphodiester liant l'analogue à l'ADN.

Cette réaction entraîne l'excision de l'analogue et la libération du groupement OH du dernier nucléotide. La synthèse de l'ADN viral peut alors reprendre. Ce mécanisme sensible est efficace pour la zidovudine. L'incorporation des désoxynucléotides naturels et de la plupart des analogues nucléosidiques dans l'ADN est rapidement suivie de leur translocation en un « complexe fermé » et, dans cette conformation, la liaison phosphodiester est réfractaire à l'excision par l'ATP. La mutation M184V semble entraîner une diminution de la pyrophosphorolyse, ce qui inhiberait ainsi l'effet des TAM(51).

Les TAM sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI à des niveaux divers, sauf à la 3TC et au FTC. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAM et de l'INTI. Par ailleurs, les mutations K70R et K219Q/E ont moins d'impact que les quatre autres sur la résistance croisée.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

La mutation M184V, en présence de TAM, augmente la résistance in vivo à l'Abacavir et n'a pas d'impact sur la Tenofovir ni la didanosine.

### **3.6.7.3.2. Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :**

Les inhibiteurs non nucléosidiques comme l'Éfavirenz et la Nevirapine pour les molécules de première génération sont de petites molécules qui se fixent au niveau d'une poche hydrophobe située à proximité du site catalytique de la transcriptase inverse.

Ces composés sélectionnent des mutations situées au niveau de leur site de fixation qui affecte la flexibilité de l'enzyme, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN. Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisque une mutation au niveau de la poche hydrophobe confère une résistance croisée entre Éfavirenz et Nevirapine, INNTI de première génération.

De nouvelles molécules de seconde génération, comme l'Étravirine et la Rilpivirine sont actives in vitro et/ou in vivo sur certains virus ayant une résistance aux INNTI de première génération(52,53). L'essai DUET a ainsi démontré que la mutation K103N n'avait pas d'impact délétère sur la réponse virologique à l'Étravirine. En revanche, la mutation Y181C a un impact négatif quand elle est associée à d'autres mutations de résistance aux INNTI. Enfin, les mutations Y181I/V, même isolées, réduisent significativement la réponse à l'Étravirine(54)

Il existe in vivo une résistance croisée élevée entre Étravirine et Rilpivirine. Il est évident que l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI de première génération diminue l'efficacité de l'Étravirine : il est donc recommandé de ne pas laisser une réplique résiduelle sous Éfavirenz ou Nevirapine pour ne pas accumuler ces mutations et réduire l'efficacité de traitement ultérieur par des molécules de seconde génération telles que l'Étravirine ou Rilpivirine.

### **3.6.7.3.3. Inhibiteurs de protéase (IP) :**

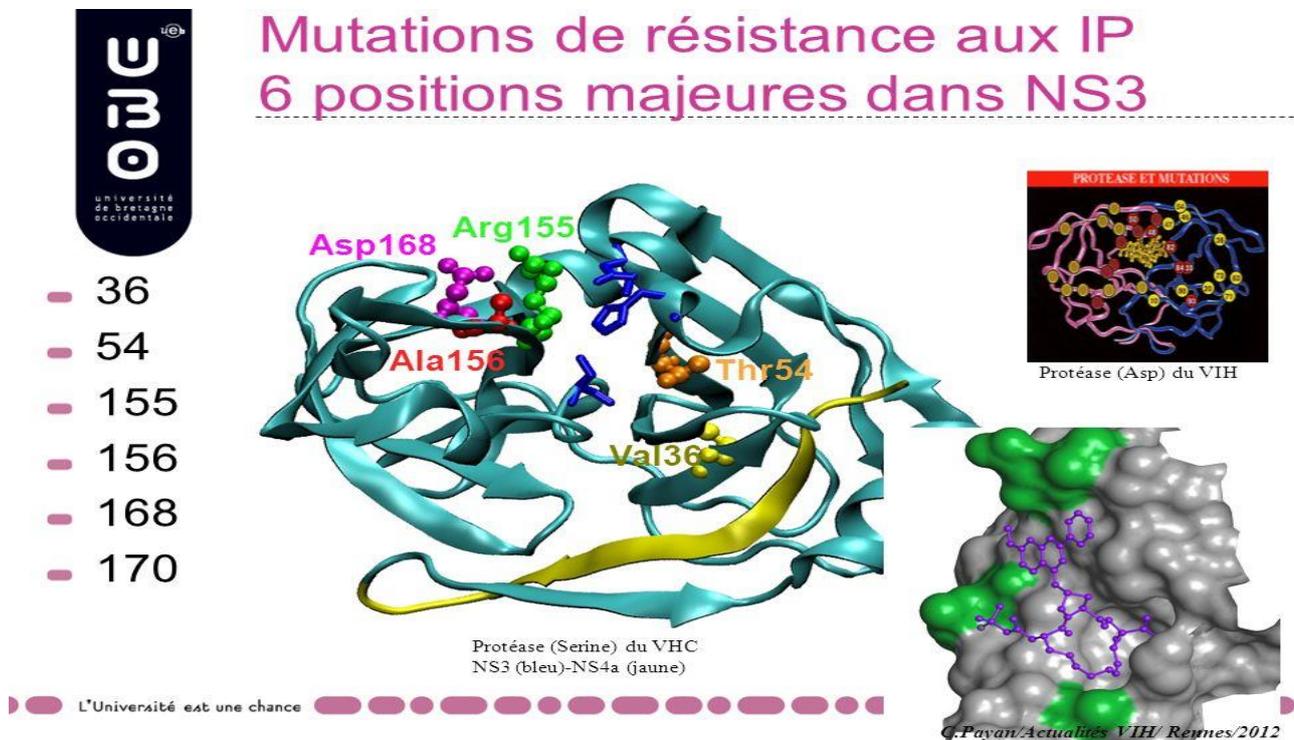
Les inhibiteurs de protéase (IP) constituent une famille importante qui bénéficie d'une barrière à la résistance élevée même s'il existe au sein de cette classe une importante résistance croisée.

La résistance aux IP est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations au niveau du site actif de l'enzyme et à distance de celui-ci. On distingue des mutations de résistance majeures et mineures :

- Les mutations mineures/secondaire, qui sont des mutations pouvant faire partie du polymorphisme de la protéase virale, apparaissent plus tardivement et vont augmenter la résistance aux IP et aider le virus à retrouver ses capacités répliquatives.
- Les mutations majeures/primaires sont généralement sélectionnées les premières lors d'un échappement et diminuent la liaison des IP à leur substrat enzymatique.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

De nombreuses études montrent qu'il existe une grande différence entre les IP potentialisés par le ritonavir (IP/r) et les IP non potentialisés en terme de réponse virologique et de taux de sélection de mutations de résistance chez les patients naïfs d'antirétroviraux(55).



**Figure 7:** Position des principales mutations de résistance aux IP(56).

#### 3.6.7.3.4. Les inhibiteurs d'entrée :

L'entrée du virus dans la cellule requiert plusieurs étapes, avec successivement la liaison de la gp-120 à la molécule CD4, puis à un corécepteur, récepteur de chimokines, CCR5 et/ou CXCR4. Ces événements sont responsables de l'association des deux boucles trimériques, HR-1 et HR-2 (HeptadRepeat), localisées dans la gp 41, conduisant à un rapprochement des membranes virale et cellulaire et à leur fusion. La composition en acides aminés de la boucle variableV3 de la gp-120 détermine la reconnaissance spécifique du corécepteur.

- **Inhibiteur de fusion :**

L'inhibiteur de fusion, enfuvirtide ou T20 (Fuzéon), est un peptide de 36 acides aminés dérivé de la région HR-2 de la gp-41. Il se fixe à la boucle trimérique HR-1 inhibant ainsi la fusion et l'entrée du virus dans la cellule. Des mutations dans HR-1 réduisant la sensibilité au T-20 ont été identifiées in vitro mais aussi in vivo chez des patients échappant à l'enfuvirtide dans les essais cliniques(57). Ces mutations sont situées au niveau des codons 36 à 45 du gp 41. Elles apparaissent rapidement (quelques semaines) en cas de répllication virale sous T 20. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

dans HR-2, mais elles n'ont pas d'impact sur la résistance au T 20 et compensent probablement des mutations de HR-1 pour la capacité répliquative virale.

Il n'existe pas de résistance croisée entre le T20 et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs du corécepteur CCR5.

- **Inhibiteur des corécepteurs :**

De petites molécules inhibitrices de l'interaction gp-120-CCR5, telles que le maraviroc, sont des antagonistes allostériques non compétitifs qui se lient au même site que la gp-120 sur le corécepteur CCR5. Le maraviroc (Celsentri) a obtenu son autorisation de mise sur le marché en Europe chez les patients prétraités par antirétroviraux et infectés par des isolats VIH à tropisme R5. In vitro, la résistance au maraviroc est liée à des échappements de la gp-120 qui permettent à l'enveloppe virale de s'attacher au complexe CCR5-Maraviroc(58).

- **Test de tropisme :**

Les tests de tropisme actuellement disponibles sont soit des tests phénotypiques, soit des tests génotypiques. Le test phénotypique commercialisé est le test Trofile® (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, Etats-Unis).

Le test ESTA a été notamment utilisé dans la réalisation de l'essai Merit (Maraviroc chez les patients naïfs)(59). Dans tous les cas, il ne peut être réalisé à partir de l'ARN plasmatique que lorsque les charges virales sont supérieures à 1000 copies /ml. Il existe d'autres tests phénotypiques disponibles de ce cas dans la recherche : le test PhenX-R (InPheno, Basel, Switzerland) et le Toulouse Tropisme Test (TTT, Université de Toulouse-III Paul-Sabatier(60).

Les tests génotypiques de tropismes sont fondés sur l'analyse de la séquence de la boucle V3 de la gp-120 du virus du patient avec différents systèmes d'interprétation disponibles(61).

Les tests génotypiques de tropisme peuvent être réalisés à partir de l'ADN viral chez les patients avec des CV plasmatiques faibles ou indétectables mais il existe peu de données sur la validation des tests génotypiques de détermination de tropisme pour les virus de sous-type non-B(62).

### **3.6.7.3.5. Inhibiteurs d'intégrase (INI) :**

En décembre 2007, le premier inhibiteur de l'intégrase (INI), le Raltégravir, obtenait son autorisation de mise sur le marché (AMM).

La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection et à l'émergence, sous traitement, de variant viraux initialement minoritaires, portant des mutations de résistance.

In vivo, trois profils majoritaires distincts comportant soit la mutation N 155H, soit la mutation Q148H/K/R, ou la mutation à la position 143 associés à une ou plusieurs mutations secondaires, ont été mis en évidence en cas d'échappement virologique au Raltégravir(63).

En ce qui concerne l'élvitégravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment les mutations E92G/Q ou N155H ou Q148R/K(64). Il existe une résistance croisée très importante entre la Raltégravir et l'élvitégravir. La barrière génétique des molécules de 1ère génération (Raltégravir et Elvitégravir) de cette classe est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules.

Le Dolutégravir, ayant un profil de résistance différent du Raltégravir et de l'élvitégravir. Cette molécule est actuellement efficace sur des virus résistants aux molécules de 1ère génération mais reste résistant à tous les virus qui portent la mutation Q148R/K.

#### **3.6.7.4. Les tests de résistance :**

- Tests génotypiques :

Les tests génotypiques analysent les mutations présentes sur les gènes codant les protéines cibles des antirétroviraux (TR, protéase, gp41, intégrase). L'analyse de toute la séquence des gènes de la transcriptase inverse et de la protéase est la technique de référence en matière des tests génotypiques.

Un contrôle de qualité, organisé chaque année successivement depuis 2001 par le groupe résistance AC11 de l'ANRS, puis par le CNR VIH Résistance aux antirétroviraux depuis 2008, concerne actuellement une cinquantaine de laboratoires, incluant quelques laboratoires de ville. La fréquence de résultats faussement positifs (Mutation de résistance retrouvée alors que la séquence est sauvage) est basse, mais celle de faux négatifs (mutation de résistance non détectée) est plus élevée.

Cette sous-estimation des mutations de résistance est rapportée dans d'autres contrôles de qualité en Europe. Le contrôle de qualité a un rôle pédagogique important, comme l'a montré l'augmentation des performances des laboratoires depuis son instauration(65).

- Tests phénotypiques :

Deux firmes proposent des tests phénotypiques commerciaux utilisant une technique de virus recombinants : le test Antivirogram de Virco et PhenoSene de Monogram. En plus des tests Antivirogram et PhenoSene il existe le test phénotypique virtuel de Virgo. Ce test permet de prédire la sensibilité phénotypique d'un isolat en se basant sur son test génotypique de résistance.

#### **3.6.7.5. Critères de demande de génotypage au Mali**

Comme les tests de résistance sont coûteux, le Mali a décidé de les utiliser uniquement pour les patients en échec de 2ième ligne vue la complexité pour proposer un traitement de 3ième ligne.

- Patients en échec de 2ème ligne thérapeutique après avoir éliminé un problème d'inobservance qui va nécessiter plutôt un renforcement de l'observance
- Patients ayant épuisé les classes thérapeutiques d'ARV (INTI, INNTI et IP)
- Avoir une charge virale détectable ( $\geq 1000$  copies/ml) récente datant de moins de 15 jours

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- Garder le patient en échec sous le même traitement pour faire le prélèvement
- Avant tout prélèvement, le dossier du patient doit être présenté au staff clinico-biologique à Bamako (CSLS/MS) au préalable pour validation.

## 4. METHODOLOGIE

### 4.1. Cadre et lieu d'étude :

Notre étude s'était déroulée au laboratoire « SEREFO » de l'UCRC. Le centre de recherche et de formation sur le VIH/SIDA et la tuberculose (SEREFO/CEREFO), signifie Témoignage en langue « Bambara ». Ce nom a été attribué au centre pour lutter contre la stigmatisation faite aux personnes vivantes avec le VIH/SIDA. Il est une entité du Centre International d'Excellence en Recherche (ICER), de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB). SEREFO est une initiative de recherche biomédicale entre les instituts nationaux de la santé aux Etats-Unis d'Amérique (NIH-NIAID) et l'Université des Sciences, Techniques et Technologies de Bamako, Mali.

La principale mission du programme SEREFO est de mener des activités de recherches pointues et durables afin d'améliorer la santé de la communauté Malienne et internationale en conduisant la recherche durable en clinique et en biologie sur les maladies bactériennes et virales avec un accent particulier sur l'immunologie et la biologie moléculaire du VIH, et de *Mycobacterium tuberculosis*. SEREFO travaille en collaboration avec tous les CS.Réf des six communes du district de Bamako, ARCAD /SIDA-CESAC et le service de pneumo-physiologie du CHU du point G pour le recrutement des patients dans les différentes études du CHU Point G, Hôpital Gabriel TOURE. SEREFO possède 3 principaux laboratoires :

- ✓ Le laboratoire de recherche sur la résistance au VIH : Il est composé d'un laboratoire de charge virale et de séquençage des cas suspects de résistance au traitement antirétroviral (ARV) pour le suivi des personnes infectées par le VIH.
- ✓ laboratoire d'immunologie : C'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.
- ✓ laboratoire de tuberculose : est composé d'un laboratoire de biologie moléculaire et d'un laboratoire de Biosécurité Niveau 3 (BSL-3). Le laboratoire est actuellement focalisé sur la recherche en mycobactériologie, puisque la tuberculose est une coïnfection importante chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et dans le diagnostic de la maladie à fièvre hémorragique (Ebola).

### 4.2. Type et période d'étude :

Il s'agissait d'une étude transversale et prospective, qui s'était déroulée de mars 2013 à décembre 2016.

#### **4.3. Population d'étude :**

Notre étude a porté les patients adultes infectés par le VIH-1, en échec virologique de traitement antirétroviral de deuxième ligne à Bamako.

#### **4.4. Critères d'inclusion :**

Nous avons inclus dans notre étude tous patients ayant :

- ✓ Une infection par le VIH-1, sous traitement antirétroviral et ayant reçu toutes les trois classes des Antirétroviraux disponibles au Mali (INTI, INNTI et IP).
- ✓ Une charge virale élevée ( $\geq$  à 1000 copies/ml) et suivi dans un site de prescription des Antirétroviraux.
- ✓ Une mesure du taux de LT CD4 disponible.
- ✓ Consentir à participer à l'étude.

#### **4.5. Critères de non inclusion :**

Nous n'avons pas inclus dans notre étude des :

- ✓ Patients non infectés par le VIH.
- ✓ Patients infectés par le VIH-2 ou VIH-1/VIH-2.

#### **4.6. Définition des cas :**

**Echec virologique :** Au Mali, l'échec virologique est défini comme étant une charge virale supérieure ou égale à 1000 copies/ml sur la base de deux charges virales consécutives à 3 mois d'intervalle après 6 mois de traitement bien conduit(44).

**Le traitement ARV de deuxième ligne:** Il est indiqué chez un patient en échec thérapeutique de première ligne de traitement ARV.

#### **4.7. Saisie et analyse des données**

Nos données ont été saisies dans Microsoft Word et Excel et analysées par le logiciel Epi Info 7.2

Nos références ont été collectées et insérés avec le logiciel Zotero.

#### **4.8. Méthodes utilisées :**

Il s'agissait de faire le génotype de résistance pour tous les patients inclus dans notre étude en utilisant la technique Viroseq (une technique commerciale) et la technique de l'ANRS (une technique maison).

Les données sur les paramètres démographiques, comme l'âge et le sexe, les renseignements sur les traitements reçus ainsi que les paramètres immunologiques ont été obtenus à partir des fiches de demande de charge virale et du test de génotype adressées au laboratoire.

#### **4.8.1. La technique Viroseq®**

##### **4.8.1.1. Principe de la technique :**

Le viroseq™ HIV-1 Genotyping System détecte les mutations dans les régions de la transcriptase inverse (TI) et de la protéase (PR) du gène pol et fournit un rapport présentant les preuves génétiques d'une résistance virale. Il s'agit d'un système complet fournissant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, à la PCR et à la réaction de séquence. La totalité du gène de la protéase et les deux tiers du gène de la TI sont amplifiés pour générer un amplicon de 1,8 kb. Cet amplicon est utilisé comme matrice de séquençage pour 7 amorces générant une séquence consensus d'environ 1,3 kb.

Pour effectuer le test avec cette technique, il a été essentiel de suivre succinctement les processus suivants :

- ✓ Préparation des échantillons (extraction de l'ARN viral plasmatique)
- ✓ RT-PCR et quantification de l'ADN
- ✓ Electrophorèse
- ✓ Séquençage
- ✓ Analyse des données de séquence
- ✓ Génotype et rapport de résistance

##### **4.8.1.2. Organisation de la paillasse :**

Les différentes étapes de la procédure ont été effectuées dans des zones de travail bien distinctes :

- ✓ Zone 1 : pour la préparation des échantillons,
- ✓ Zone 2 : pour la préparation des Mix, appelée zone propre
- ✓ Zone 3 : qui correspond à la zone où sont traités les produits amplifiés (ADN amplifié)

##### **4.8.1.3. Réactifs et matériels :**

###### **Zone 1**

###### **Réactifs**

- Module de préparation des échantillons :
  - HIV Viral Lysis Buffer (tampon de lyse virale du VIH), tube de 14,4ml contenant du thiocyanate de guanidine, 43% dithiothréitol, < 2% N-Lauroylsarcosine, < 1%.
  - RNA Diluent (diluant ARN), tube de 1,6 ml
- Isopropanol à 100% anhydre (ACS grade)
- Ethanol à 100%, non dénaturé (MB grade)
- Ethanol à 70% pour le nettoyage
- Hypochlorite de sodium à 10%,

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- Eau désionisée stérile sans RNase/DNase
- Viroseq™ HIV-1 8E5 Control Module (module de control)
  - HIV-1 8E5 Positive control (control positif HIV-1), tube de 500 µl.
  - Il a été préparé par dilution de virus VIH-1 de type B en culture (8E5) dans du plasma humain négatif pour l'ARN du VIH et non réactif pour l'Ag HBs et pour les anticorps anti-VIH-1/2 anti-VHC, anti-HTLV-1 par des tests approuvés. Le virus 8E5 contient un génome viral intact mais défectueux par insertion d'une seule base au codon 219 du gène de la RT. La charge virale est comprise entre 50 000 et 100 000 copies/ml
  - HIV-1 8E5 Négatif Control (control négatif HIV-1), tube de 950 µl. Le control négatif contient du plasma humain normal sans ARN du VIH et a été trouvé non réactif pour l'AgHBs et pour les anticorps anti-VIH-1/2, anti-VHC, anti-HTLV-1 par des tests approuvés.

✓ **Matériels et consommable :**

- Hotte de sécurité biologique à flux laminaire, propre
- Micropipettes de 10 à 1000 µl
- Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µl
- Tubes stériles de 1,5 ml munis de bouchons à vis (sans RNase/DNase) pouvant supporter une vitesse de 21000 à 25000 ×g
- Un chronomètre
- Des marqueurs de tube
- Un vortex
- Une centrifugeuse, rotation rapide des microtubes (2000×g)
- Une centrifugeuse, réfrigérée (21000 à 25000×g) avec rotor hermétiquement fermé pour tube de 1,5 ml
- Gants, sans lac
- Blouses de laboratoire
- Congélateur et réfrigérateur satisfaisant aux conditions de conservation indiquées dans la documentation relative aux produits

**Zone 2 :**

**Réactifs**

- Viroseq™ HIV-1 RT-PCR Module
  - HIV RT Mix, tube de 384 µl, contenant dATP, dCTP, dGTP et dTTP (amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%).
  - RNase inhibitor, tube de 48 µl, inhibiteur de RNase, 20 U/µl

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- MuLV Reverse transcriptase, tube de 48 µl, contenant la Transcriptase inverse du virus (recombinant) de la leucémie murine, 50 U/µl.
- HIV PCR Mix, tube de 1,42 ml, contenant dATP, dCTP, dTTP, dUTP, < 0,1% (amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%)
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, tube de 24 µl, contenant l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, 5U/µl
- AmpErase® UNG, tube de 48 µl, contenant l'Uracile N-glycosylase, 1U/µl.
- DTT (100 mM), tube de 20 µl contenant le Dithiothréitol, 1,4%

✓ **Matériels et consommables :**

- PCR chamber à lumière UV (lampe UV de 300 nM)
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse, rotation rapide des microtubes (2000 × g)
- Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µl
- Pipettes de transfert à embout fin de 0-1000 µl
- PCR tubes de marques thermo GridTM de 0,2ml
- Des marqueurs de tube
- Base de couvercle " StrataCooler" (conserver à - 20°C)
- Un congélateur et un réfrigérateur satisfaisant aux conditions de conservation indiquées dans la documentation relative aux produits.

**Zone 3**

**Réactifs**

- Agarose Gel Loading Buffer (tampon de charge en gel d'agarose), tube 240 µl
- DNA Mass Ladder, tube 36 µl marqueur de taille ADN, < 0,1%
- Tampon TBE, 10X
- Bromure d'éthidium
- Viroseq™ HIV-1 sequencing module (module de séquençage) :
  - Loading Buffer (tampon de charge), tube de 336 µl
  - Formamide, Recrystallized (formamide recristallisé) tube de 1,68 ml, > 95%
  - HIV SEQ Mix A, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaQ FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
  - HIV SEQ Mix B, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1,

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

- HIV SEQ Mix C, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

-HIV SEQ Mix D, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

- HIV SEQ Mix F, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

- HIV SEQ Mix G, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

- HIV SEQ Mix H, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase ampliTaq®FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

✓ Matériels et consommables :

- Thermocycler à 96 puits programmé
- Balance pour peser
- Four à micro-onde
- Système d'électrophorèse sur gel d'agarose (cuve à gel à alimentation électrique, 10 V/cm de gel d'agarose)
- Rouleau de papier d'aluminium
- Plaques de centrifugation 96 puits CENTRI SEP
- Agitateur, vortex
- Tubes
- Centrifugeuse rotation rapide des microtubes
- Pipettes multichannelles de 10 à 100 µl
- Embouts résistants aux aérosols, sans Rnase, 10 à 1000 µl
- Pipettes de 10 à 1000 µl
- Centrifugeuse avec pompe à vide (en cas d'utilisation de plaques de centrifugation CENTRI SEP TM)
- Plaques de centrifugation 96 puits CENTRI SEP

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- Plaques optiques de réaction " 96-well optical reaction plate"
- Films optiques "optical adhesive cover"

#### 4.8.1.4. Préparation des échantillons :

Elle s'était effectuée dans la zone 1.

Un volume de 500 µl de plasma était ultra centrifugé à 21000g pendant une heure à 4°C. Le surnageant était retiré et 600 µl de tampon de lyse étaient ajoutés au culot. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 600 µl d'isopropanol étaient additionnés, le mélange était centrifugé à 13000g pendant 15min à 20°C. Le surnageant était prélevé et le culot d'ARN était lavé dans 1ml d'éthanol à 70%. Après centrifugation à 13000g pendant 5 min à 20°C, le surnageant était retiré, et le culot d'ARN était repris dans 50 ou 100 µl d'ARN diluant selon la CV et conservé à -80°C, soit passé directement à la PCR si la réaction de RT/PCR était effectuée dans l'heure après, pour plus d'assurance tout le travail a été effectué sous une hotte. Chaque culot a été résuspendu avec le RNA Diluent froid en accord avec les indications ci-dessous et maintenu dans de la glace :

SI la charge virale est	Ajouter
>15 000 copies/ml	100µl RNA Diluent
2000-15 000 copies/ml	50µl RNA Diluent
Inconnue	50µl RNA Diluent

#### 4.8.1.5. Réaction de la RT-PCR :

Les réactifs décongelés (vortexer la RT Mix et le DTT, les enzymes RNase Inhibitor et la MuLV RT n'ont pas été vortexer) et stockés à 2-8°C

La RT Master mix a été préparée de la façon suivante :

Réactifs	Volume (µl/échantillon)
<b>HIV RT Mix</b>	<b>8</b>
<b>RNase Inhibitor</b>	<b>1</b>
<b>MuLV RT</b>	<b>1</b>
<b>DTT</b>	<b>0,4</b>

Vortexer, brève centrifugation et garder le mélange à température ambiante. Distribué 10µl d'ARN extrait dans chaque tube et le mettre dans un thermocycler ABI réglé de la manière suivante :

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Température	Temps	Processus
65°C	30 secs	Libère et relâche les structures secondaires de l'ARN
42°C	5min	Refroidir pour la température optimale de l'enzyme
	PAUSE	
42°C	60min	Reverse transcription
99°C	5min	Inactivation du MuLV RT
4°C	Hold (>10 min)	Maintien de la température de + 4°C

A l'étape de la pause, il a été ajouté 10µl de RT master mix sur les échantillons sortis du thermocycler puis remis dans l'appareil pour continuer la réaction. A la fin de cette réaction, laisser les à +4°C pendant au minimum 10 min avant de continuer avec la PCR, ou stocker à -20° C si on devrait laisser pour une longue durée.

#### 4.8.1.6. Réaction de la PCR :

Les réactifs ont été décongelés (Vortexer la PCR mix et l'UNG et les centrifuger tous avec l'AmpliAq).

**Tableau III** : Préparation de la PCR master-mix dans un microtube et dans de la glace.

Réactifs	Volume (µl/échantillon)
PCR mix	29,5
AmpliAq Gold	0,5
UNG	1,0

Ajouté 30µl de PCR Master mix dans chaque tube provenant de la réaction de la RT, et chargé les échantillons sur le thermocycler.

**Tableau IV : Programme utilisé sur le thermocycler.**

Nombre de cycle	Température	Temps	Processus
1	50°C	10min	UNG activation
1	93°C	12min	AmpliTaq Gold activation
40	93°C 64°C 66°C	20secondes 45secondes 3min	DNA dénaturation Hybridation des amorces Extension des amorces
1	72°C	10min	Final Extension
-	4°C	Hold	-

Après cette étape les produits de la RT étaient stockés à -20°C lorsque la technique n'était poursuivie dans les 24 heures.

#### **4.8.1.7. Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence :**

Cette préparation s'était déroulée dans la zone post amplification, décongelé le Gel Loading Buffer et le Low DNA Mass Ladder (marqueurs de poids moléculaire). Les produits obtenus à la fin de la PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1%.

**Préparation du gel d'agarose :** 150 ml de tampon TBE (pH 8,3) ont été mélangés à 1,5 g d'agarose pure et le mélange a été porté à ébullition dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes pour faire fondre l'agarose.

#### **4.8.1.8. Réaction de séquence :**

Elle s'était déroulée aussi dans la zone post-amplification, après avoir décongelé les 7 amorces à l'abri de la lumière, distribué 12µl de chaque amorces (primer) du kit Viroseq (A, B, C, D, F, G et H) sur une nouvelle plaque de PCR et ajouté 8µl de produits de PCR dans chaque puits contenant l'un des sept (7) amorces. Après un léger vortex et centrifugation, les échantillons ont été chargés sur le thermo cycler avec le programme suivant :

Nombre de cycle	Température	Temps	Processus
25	96°C 50°C 60°C	10 secondes 5 secondes 4 minutes	DNA dénaturation Primer Annealing Primer Extension
-	4°C	HOLD	-

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Après la réaction de séquence, procédé à la purification des produits de PCR séquence par la méthode « NUCLEO FAST 96 de Machely Nagel ».

#### **4.8.1.9. Préparation des échantillons à charger dans le séquenceur :**

Le montage du dispositif a été effectué pour lancer la plaque sur le séquenceur. Après les maintenances nécessaires du séquenceur, la plaque était introduite dans son réceptacle puis introduite dans le séquenceur. Créer un fichier au niveau du logiciel qui se trouvait sur l'ordinateur relié au séquenceur ensuite on suit la procédure de lancement de la plaque.

#### **4.8.1.10. Détection des mutations et analyse des données :**

A la fin des runs, les échantillons ont été analysés immédiatement par Sequençing analysis sur l'ordinateur relié au séquenceur, puis réanalysés sur un autre ordinateur où les séquences ont été ensuite alignées par rapport à une séquence de référence de VIH-1, HXB2, grâce au logiciel Viroseq. Les mutations de résistance étaient répertoriées en soumettant la séquence dans la base de données stanford et celle de l'ANRS (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>) et la recherche d'homologie entre nos séquences et celles d'autres isolats a été faite à partir de cette base de données. Le site ([www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi](http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi)) a été utilisé pour identifier les sous types de VIH rencontrés chez nos patients, en soumettant les séquences dans la base de données de ce site. Le rapport de résistance aux antirétroviraux généré par le logiciel Viroseq a été discuté au staff clinico-biologique de CSLS et remis au médecin pour la prise en charge.

### **4.8.2. Technique de génotypage de résistance du VIH-1 selon les protocoles de l'ANRS**

#### **4.8.2.1. Extraction de l'ARN du VIH-1**

##### **4.8.2.1.1. Préparation des réactifs(66).**

##### **4.8.2.1.1.1. Ajout de RNA 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** requis en fonction du nombre d'échantillons à traiter avec les formules suivantes :

$$n \times 0,56 \text{ mL} = y \text{ mL}$$

$$y \text{ mL} \times 10 \text{ µL/mL} = z \text{ µL}$$

Avec :

- **n** = nombre d'échantillons à traiter ;
- **y (mL)** = volume de **tampon AVL** à utiliser ;
- **z (µL)** = volume d'**ARN carrier-tampon AVE** à ajouter au **tampon AVL**.

#### **4.8.2.1.1.2. 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.

#### **4.8.2.1.1.3. 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.

#### **4.8.2.2. Procédure d'extraction**

##### **4.8.2.2.1. Concentration de L'ARN**

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

##### **4.8.2.2.2. Extraction de l'ARN**

1. Conserver **140 µL de culot (rejeter 860 µL de surnageant) dans le tube de 1,5 mL pour le VIH-1.**
2. Ajouter **560 µL de tampon AVL-RNA carrier-tampon AVE** et mélanger par impulsion-vortex 15 secondes;
3. Incuber à la température du laboratoire (**15-25°C**) pendant 10 minutes pour assurer la lyse complète des particules virales;
4. Faire une brève centrifugation (**8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C**) pour enlever des gouttes à l'intérieur du couvercle;
5. 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 ;
6. 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 ;

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

7. 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 ;
8. 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<sup>er</sup> lavage** ;
9. 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<sup>ème</sup> lavage** ;
10. 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;
11. 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** ;
12. Centrifuger à **8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C** ;
13. Jeter la colonne à filtre et boucher le tube stérile contenant les **ARNs élués**. conserver l'éluât à **-80°C**.

#### **4.8.2.3. PCR à partir de l'ARN rétroviral extrait, migration, sur le gel d'agarose, purification, réaction de séquence, précipitation éthanolique, séquençage et analyses bioinformatiques.**

##### **4.8.2.3.1. Reconstitution des oligonucléotides (amorces)**

Les amorces sont fournies dans des tubes sous forme lyophilisée.

- ✓ Il faut 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 PCRs

##### **4.8.2.3.2. Amplification par PCR**

###### **4.8.2.3.2.1. Reverse transcription / Amplification (RT/PCR) ; Kit Titan (Roche)**

Les amorces utilisées pour la première PCR du VIH-1 sont :

- **5P1/ 3P1** pour la protéase;
- **MJ3/MJ4** pour la transcriptase inverse.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Tableau V** : Composition du mélange réactionnel pour une réaction de RT/PCR de VIH-1

	<b>Concentration stock</b>	<b>Volume par tube (µL)</b>
<b>Tampon 5X (Buffer)</b>	5X	10
<b>DiThioThrétol (DTT)</b>	100 mM	2,5
<b>dNTP mix</b>	10 mM	4
<b>Amorce sens</b>	30 µM pour le VIH-1	1
<b>Amorce antisens</b>	30 µM pour le VIH-1	1
<b>Rnase Inhibitor</b>	5U/µL	1
<b>Enzyme Mix</b>	—	1
<b>H<sub>2</sub>O (qualité biologie moléculaire)</b>	—	19,5
<b>ARN patient</b>	—	10
	<b>Volume final</b>	50

**Tableau VI**: Conditions d'amplification de la première PCR pour le VIH-1

	<b>Températures</b>	<b>Temps</b>	<b>Cycles</b>
<b>Reverse transcription</b>	50°C (VIH-1)	30 min	1 X
<b>Activation enzymatique + dénaturation</b>	94°C	2 min	1 X
<b>Cycles d'amplification</b>	94°C	30 s	40X
	55°C	30 s	
	68°C	1 min 30 s (VIH-1)	
<b>Elongation</b>	68°C	7 min	1 X

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

#### 4.8.2.3.2.2. Nested PCR (PCR nichée) Kit Expand High Fidelity (Roche)

Les amorces utilisées pour la deuxième PCR du VIH-1 sont :

- 5P2 / 3P2 pour la protéase;
- A(35) / NE1(35) pour la transcriptase inverse.

**Tableau VII** : Composition du mélange réactionnel pour la réaction de Nested PCR pour le VIH-1

	Concentration stock	Volume par tube (µL) (pour 50 µL de volume final)
Tampon 10X (Expand Buffer 10X)	10 X	5
dNTP mix	10 Mm	1
Amorce sens	30 µM	1
Amorce antisens	30 µM	1
Expand Enzyme Polymerase	3,5 U/µL	0,4
H <sub>2</sub> O (qualité biologie moléculaire)	—	36,6
ADN obtenu après la 1 <sup>ère</sup> PCR (amplicon)	—	5
	<b>Volume final</b>	50

**Tableau VIII**: Conditions d'amplification de la deuxième PCR pour le VIH-1

	Température	Temps	Cycles
Activation enzymatique + dénaturation	95°C	3 min	1 X
Cycles d'amplification	94°C	15 s	10 X
	55°C	30 s	
	72°C	2 min	
	94°C	30 s	20 X
	55°C	30 s	
	72°C	2 min et 5 s * d'incrémentations	
Elongation	72°C	7 min	1 X
Conservation	8°C	∞	—

\*125 secondes d'incrémentations au premier cycle, puis ont été rajoutées 5 secondes à chaque cycle additionnel.

#### **4.8.2.3.3. Migration sur le gel d'agarose**

##### **4.8.2.3.3.1. Préparation du tampon TBE 10X (pour 1 litre)**

La préparation du tampon TBE 10X (pour 1 litre) se fait dans une fiole de 2 L. On y ajoute :

- un barreau aimanté
- 107,8 g de tris
- 55 g d'acide borique
- 5,8 g d'EDTA
- 500 mL d'eau distillée
- Déposer la fiole sur une platine munie d'un aimant
- Agiter jusqu'à dissolution complète des produits
- Compléter le volume d'eau pour atteindre 1000 mL
- Agiter pour homogénéiser la solution
- La conservation se fait à la température du laboratoire (15-25°C).

##### **4.8.2.3.3.2. Préparation du tampon TBE 1X (pour 1 litre)**

Diluer au dixième le tampon TBE 10X pour obtenir le tampon TBE 1X.

(Ex : 100 mL de TBE 10X ajouter 900 mL d'eau distillée pour obtenir 1000 mL de TBE 1X).

##### **4.8.2.3.3.3. Préparation du gel d'Agarose (1%)**

La préparation du gel d'Agarose (1%) se fait dans une fiole de 250 ml. On y ajoute :

- 1g d'agarose
- 100 mL de tampon TBE 1X
- Agiter le mélange
- Mettre la fiole au four à micro-onde pendant 2 minutes à 100°C
- Faire refroidir sous un robinet d'eau
- Ajouter 5µl de BET
- Mélanger
- Couler 50 mL par support après avoir mis les peignes en place
- Laisser refroidir environ 20- 30mn
- Enlever les peignes
- Le gel est prêt à être utiliser.

##### **4.8.2.3.3.4. Electrophorèse en gel d'agarose**

- Déposer le support contenant la gélose dans la cuve à électrophorèse posée sur une surface noire
- Mettre le tampon TBE 1X dans la cuve à électrophorèse jusqu'au niveau des électrodes

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- Sur du parafilm déposer 2 $\mu$ l de bleu de charge et 8 $\mu$ l d'amplicons
- Bien homogénéiser et déposer le mélange dans le puit laissé par le peigne dans la gélose
- Laisser migrer pendant 20 minutes à 110V- 85 mA
- Déposer le gel sur la plaque à UV (SPECTROLINE)
- Eteindre la lumière de la salle et allumer les UV
- Observer les migrations qui se caractérisent par une fluorescence orange dans la gélose à la même distance de migration que le témoin positif.

#### 4.8.2.3.4. Purification de l'ADN avec le kit QIAGEN

- Identifier la colonne munie de filtre
- Mettre **250  $\mu$ L** 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 $\mu$ L** de solution de lavage PE
- 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 2ml identifiés
- Ajouter 60 $\mu$ l d'eau ppi sur le filtre puis laisser incubé 5mn
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Jeter les colonnes et conserver le gène purifié à -20°C.

#### 4.8.2.3.5. Réaction de séquence

- 1- Remplir correctement la feuille de paillasse de séquençage et apprêter la plaque de séquençage.
- 2- 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
- 3- Homogénéiser juste avant de distribuer
- 4- Mettre la quantité de mix indiquée (**11 $\mu$ l**) dans les microtubes de la plaque de séquençage selon la feuille de paillasse
- 5- Ajouter la quantité d'ADN purifiée (**1 $\mu$ l**) et fermer la plaque avec du papier autocollant.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Les amorces utilisées pour la réaction de séquence du VIH-1 sont:**

- **5P2 / 3P2 pour la protéase ;**
- **A(20) / NE1(20) pour la transcriptase inverse.**

**Tableau IX :** Composition du mélange réactionnel pour une réaction de séquence des VIH-1

	<b>Concentration</b>	<b>Volume par tube (µL) (pour 12 µL de volume final)</b>
<b>Big Dye Terminator (BDT)</b>	—	1
<b>Tampon (Buffer)</b>	5X	1,5
<b>Amorce</b>	4µM	4
<b>H<sub>2</sub>O (qualité biologie moléculaire)</b>	—	4,5
<b>ADN purifié</b>	20 – 50ng/µL	1
	<b>Volume final</b>	12

**Tableau X :** Conditions d'amplification pour la réaction de séquence de VIH-1

	<b>Températures</b>	<b>Temps</b>	<b>Cycles</b>
<b>Cycles d'amplification</b>	96°C	10 s	25 X
	50°C	5 s	
	60°C	4 min	
<b>Conservation</b>	4°C	∞	—

#### **4.8.2.3.6. Précipitation éthanolique**

- Enlever la plaque du thermocycleur
- Ajouter 16 µL d'eau ppi
- Puis 64 µL d'éthanol 95-100%
- Bien homogénéiser avec la micropipette
- Fermer 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 la plaque délicatement sur du papier buvard et tapoter légèrement
- Ajouter 150 µL d'éthanol à 70%

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

- Fermer avec du papier autocollant
- Centrifuger à 2000 g (rcf) pendant 10 minutes
- Renverser délicatement la plaque, la tapoter sur du papier buvard
- Emballer la plaque dans du papier buvard, puis avec du papier aluminium. Ne pas fermer. La mettre retournée dans les plots de la centrifugeuse pour enlever toute trace de liquide
- Centrifuger à 700 g (rcf) pendant 1 minute
- Ajouter 20  $\mu$ L de formamide dans chaque microtube (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

#### 4.8.2.3.7. Electrophorèse capillaire

- Mettre en route le disjoncteur situé à l'arrière du séquenceur
- Mettre en marche l'unité centrale
- Saisir le mot de passe (**INSTR-ADMIN**)
- Une fois que tous les programmes sont chargés, allumer le séquenceur
- Attendre que le voyant vert du séquenceur soit allumé
- Lancer le programme **RUN 3130-Avant data collection série 4**
- Faire **TRAY** pour appeler le chariot contenant la plaque
- Ouvrir les portières et enlever délicatement la plaque (**l'emplacement de la plaque sur l'écran devient gris**)
- Remplacer le tampon EDTA 1X et l'eau des différents bacs (rincer les bacs à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et essuyer avant de les remplir jusqu'au trait marqué sur le bac)
- Fermer les bacs avec des septa propres et secs
- Placer les différents bacs à leur emplacement
- Changer de même le tampon EDTA 1X de l'anode après avoir rincer le verre à l'eau ppi (ne pas le rincer à l'eau de robinet)
- Mettre le tampon jusqu'au trait rouge

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

## DENATURATION

- Mettre la plaque dans le thermocycleur pendant 2-5mn à +95°C
- Retirer la plaque et la mettre aussitôt dans un bac contenant de la poudre de glace pendant au moins 5 minutes
- Nettoyer la plaque sortie de la glace pour enlever toute trace d'eau

## CHARGEMENT

- Faire **PLATE-VIEW**
- Faire **FIND ALL** et sélectionner la plaque (ex : thomas\_hiv1\_ 290610 (date))
- Faire **RUN SCHEDULER**
- Faire **TRAY** pour appeler le passeur d'échantillons et ouvrir les portières
- Placer la plaque sur le passeur d'échantillons par l'encoche et abaisser le côté opposé qui doit rentrer entre les électrodes sans forcer (**l'emplacement de la plaque devient jaune**)
- Fermer les portières
- Cliquer sur la plaque pour demander à la machine de lier la feuille de paille à la plaque (**la plaque devient verte**)
- Cliquer sur le symbole (triangle) vert dans la barre d'outils (OK)
- Le séquenceur démarre
- Faire **INSTRUMENT SETTING** pour suivre la progression de l'analyse.

### 4.8.2.3.8. Analyses bioinformatiques

Le génotypage de résistance était réalisé en utilisant la technique développée par l'AC11 de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Après le séquençage des gènes de la protéase et de la transcriptase inverse. Les séquences étaient alignées avec les séquences de références du VIH-1 (HIV-1 HXB2, numéro accession GenBank : K03455).

L'interprétation des mutations de résistance se faisait en utilisant les dernières mises à jour de l'algorithme de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

## 4.9. Considération éthique

Cette étude a été acceptée par le comité d'éthique institutionnel de la faculté de médecine et d'odontostomatologie et la faculté de pharmacie. Les consentements écrits ont été obtenus après une information, une garantie de l'anonymat et de la confidentialité de leurs données.

## 5. RESULTATS

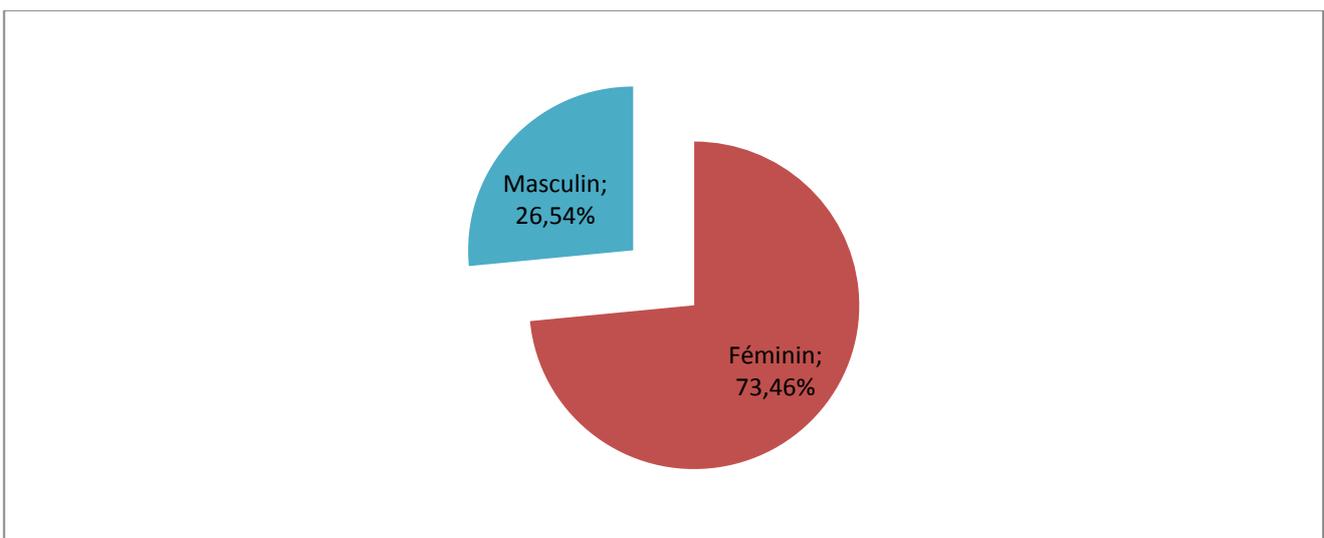
Au moment de l'étude, nous avons 1855 patients infectés par le VIH-1 sous traitements antirétroviraux de deuxième ligne à Bamako chez lesquels une étude transversale nous a permis de faire un recrutement consécutif en fin d'attendre la taille de notre échantillon. Nous avons 309 sur 1855 ce qui donnait une proportion de 16,66% (309/1855).

### 5.1. Les profils socio-démographiques des patients

**Tableau XI:** Répartition des patients en fonction de l'âge

Classe d'âge (année)	Effectif	Pourcentage (%)
< 30	80	25,89
[30-40[	131	42,39
≥ 40	98	31,72
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

Environ 42,39% de nos patients étaient dans la classe d'âge de 30 à 39 ans avec un âge moyen de  $36,11 \pm 9,68$  ans et des extrêmes de 18 ans et 70 ans.



**Figure 8:** Répartition des patients en fonction du sexe.

Les femmes représentaient 73,46% dans notre étude.

## 5.2. Les profils immuno-virologiques des patients

**Tableau XII** : Répartition des patients selon le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à l'échec.

TCD4 cellules/mm <sup>3</sup>	Effectif	Pourcentage (%)
< 100	60	19,42
[100-350[	160	51,78
[350-500[	37	11,97
≥ 500	52	16,83
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

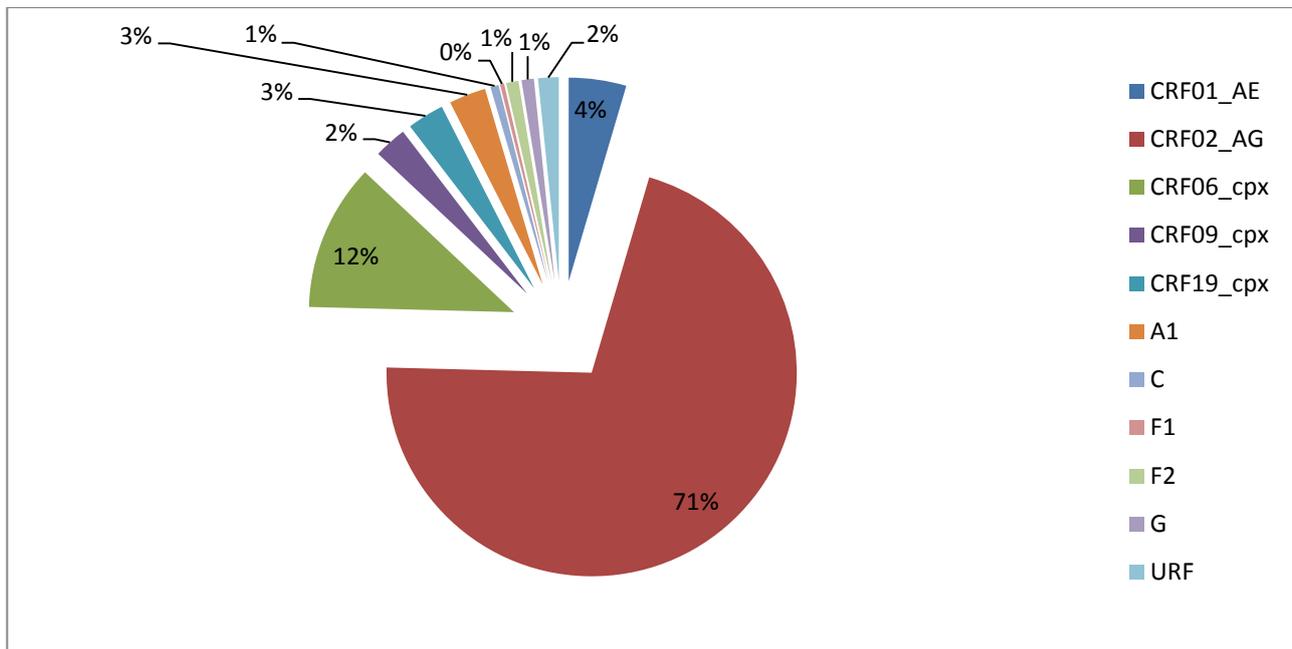
Par rapport aux LTCD4, 51,78% de nos patients avaient un taux de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> < 350 cellules/mm<sup>3</sup> avec une médiane de 193 cellules/mm<sup>3</sup> et des extrêmes de 2 et 1660 cellules/mm<sup>3</sup>.

**Tableau XIII** : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique à l'échec.

Charge virale (copies/ml)	Effectif	Pourcentage(%)
[1000-5000[	59	19,10
[5000-100000]	120	38,83
> 100000	130	42,07
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

Concernant les charges virales, 42,07% de nos patients avaient une charge virale plasmatique ≥ 100000 copies/ml. La médiane de la charge virale était de 57086 copies/ml avec des extrêmes de 1040 et 2000000 copies/ml.

### 5.3. La diversité génétique du VIH-1 des sous types chez nos patients.



**Figure 9 :** Répartition des patients en fonction des sous-types du VIH-1.

Le recombinant CRF02\_AG était le sous-type le plus prédominant avec 71% des cas, suivi du CRF06\_cpx soit 12% des cas.

### 5.4. La durée du traitement de nos patients.

**Tableau XIV :** Répartition des patients en fonction de la durée du traitement des ARV

Durée du traitement ARV (année)	Effectif	Pourcentage(%)
≤ 3	102	33,01
[4-5]	142	45,95
≥ 6	65	21,04
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

Environ 45,95% de nos patients étaient dans une tranche de durée de traitement sous ARV de quatre à cinq ans avec une médiane de durée de traitement sous ARV de quatre(4) ans et des extrêmes deux(2) et treize(13) ans.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Tableau XV** : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des INTI

<b>Durée de traitement sous ARV des INTI (année)</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
≤ 3	100	32,36
[4-5]	150	48,54
≥ 6	59	19,10
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

La durée médiane de traitement sous ARV : 4 ans.

**Tableau XVI** : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des INNTI

<b>Durée de traitement sous ARV des INNTI (année)</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
≤ 3	258	83,50
[4-5]	44	14,24
≥ 6	7	2,26
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

La durée médiane de traitement des ARV(INNTI) : 2 ans.

**Tableau XVII** : Répartition des patients selon la durée du traitement sous ARV des IP

<b>Durée de traitement sous ARV des IP (année)</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
≤ 3	254	82,20
[4-5]	42	13,59
≥ 6	13	4,21
<b>Total</b>	<b>309</b>	<b>100</b>

La durée médiane du traitement ARV(IP) : 2 ans.

### 5.5. Le nombre des molécules ARV exposées de nos patients

**Tableau XVIII** : Répartition des patients en fonction du nombre total des molécules exposées

<b>Nombre total des molécules exposées</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>4 molécules</b>	20	6,47
<b>5 molécules</b>	69	22,33
<b>6 molécules</b>	193	62,46
<b>7 molécules</b>	27	8,74
<b>Total</b>	309	100

Environ **62,46%** de nos patients étaient exposés à six molécules

**Tableau XIX** : Répartition des patients selon le nombre des molécules exposées de la famille des INTI

<b>Nombre des molécules exposées de la famille des INTI</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>3 molécules</b>	95	30,74
<b>4 molécules</b>	152	49,19
<b>5 molécules</b>	62	20,07
<b>Total</b>	309	100

Environ **49,19%** de nos patients étaient exposés à quatre(4) molécules de la famille des INTI

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Tableau XX** : Répartition des patients en fonction du nombre des molécules exposées de la famille des INNTI

<b>Nombre des molécules exposées de la famille des INNTI</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>1 molécule</b>	258	83,50
<b>2 molécules</b>	51	16,50
<b>Total</b>	309	100

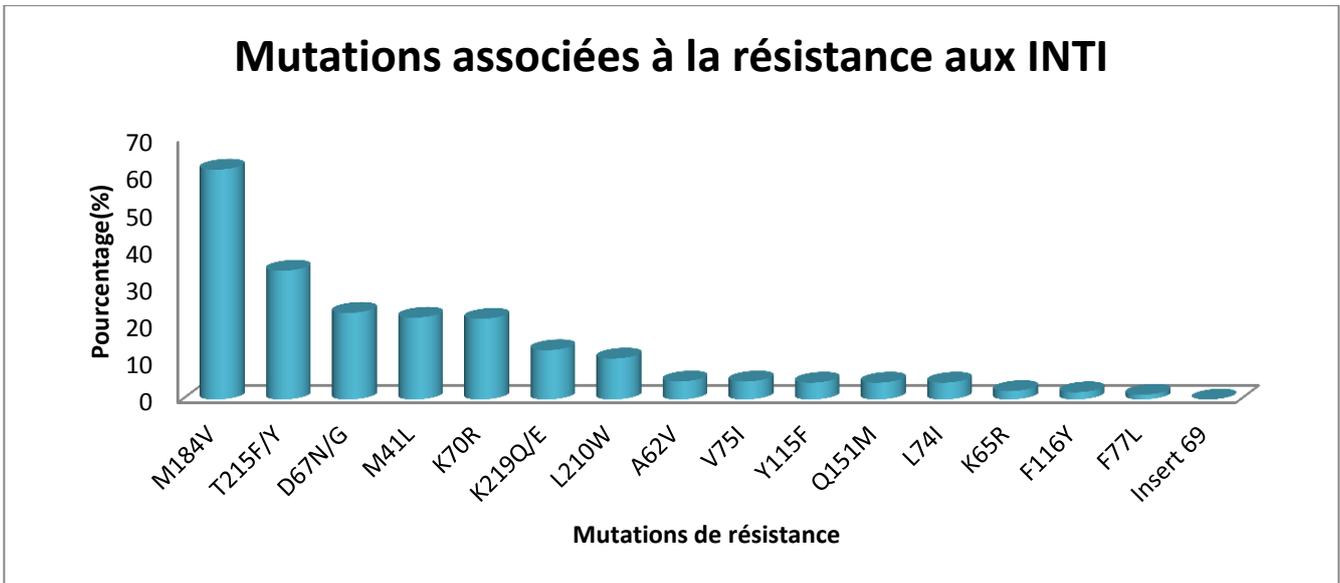
Environ **83,50%** de nos patients étaient exposés à une molécule de la famille des INNTI

**Tableau XXI** : Répartition des patients en fonction du nombre des molécules exposées de la famille des IP

<b>Nombre des molécules exposées de la famille des IP</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>1 molécule</b>	267	86,41
<b>2 molécules</b>	42	13,59
<b>Total</b>	309	100

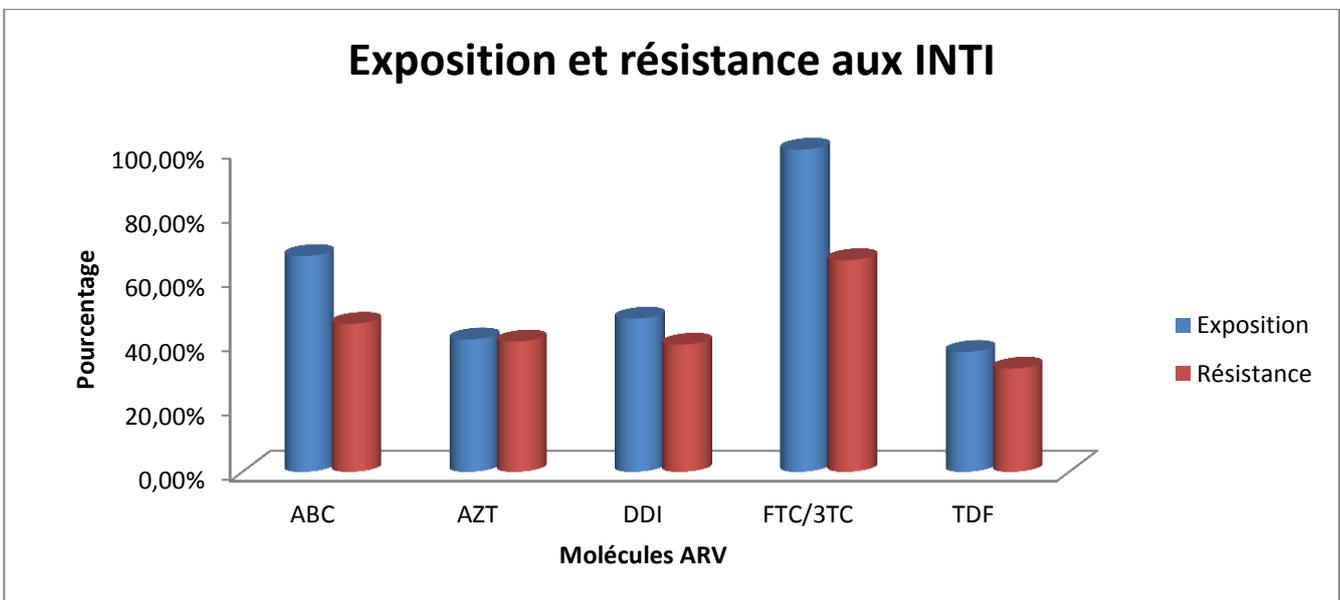
Environ **86,41%** de nos patients étaient exposés à une molécule de la famille des IP

### 5.6. Les profils des mutations de résistance chez nos patients.



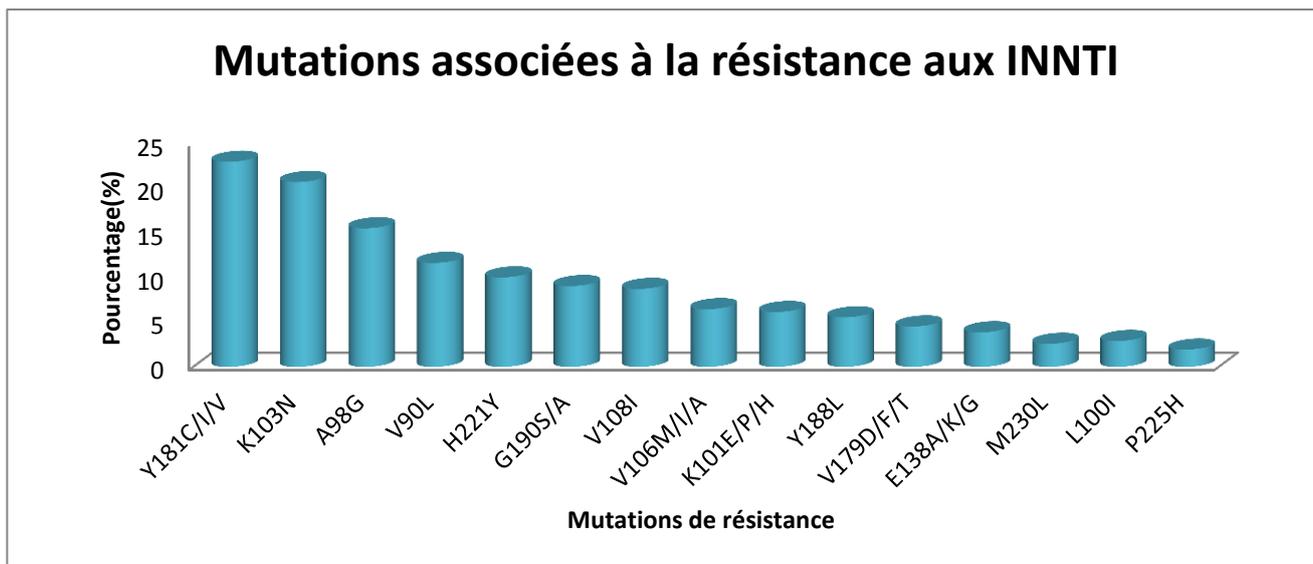
**Figure 10 :** Fréquence des mutations associées aux INTI

La mutation M184V conférant principalement de la résistance aux molécules 3TC, FTC et secondairement à l’ABC était la plus fréquente avec 61,81% des cas, suivi de la T215F /F qui est sélectionnée préférentiellement sous AZT et d4T soit 34,63%.



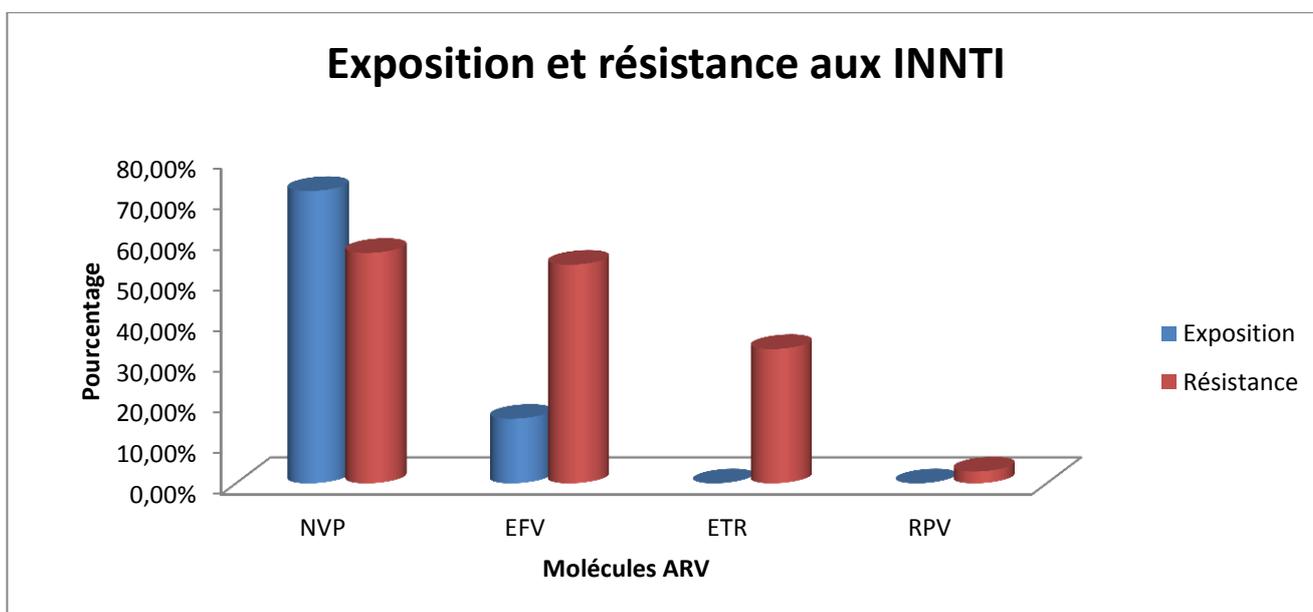
**Figure 11 :** Fréquence de la résistance par rapport à l’exposition aux INTI

Les patients étaient exposés à différentes molécules ainsi 100% des patients étaient exposés à la FTC/3TC avec 65,70% de résistance, suivi de ABC 66,99% d’exposition avec 45,97% de résistance.



**Figure 12 :** Fréquence des mutations associées aux INNTI.

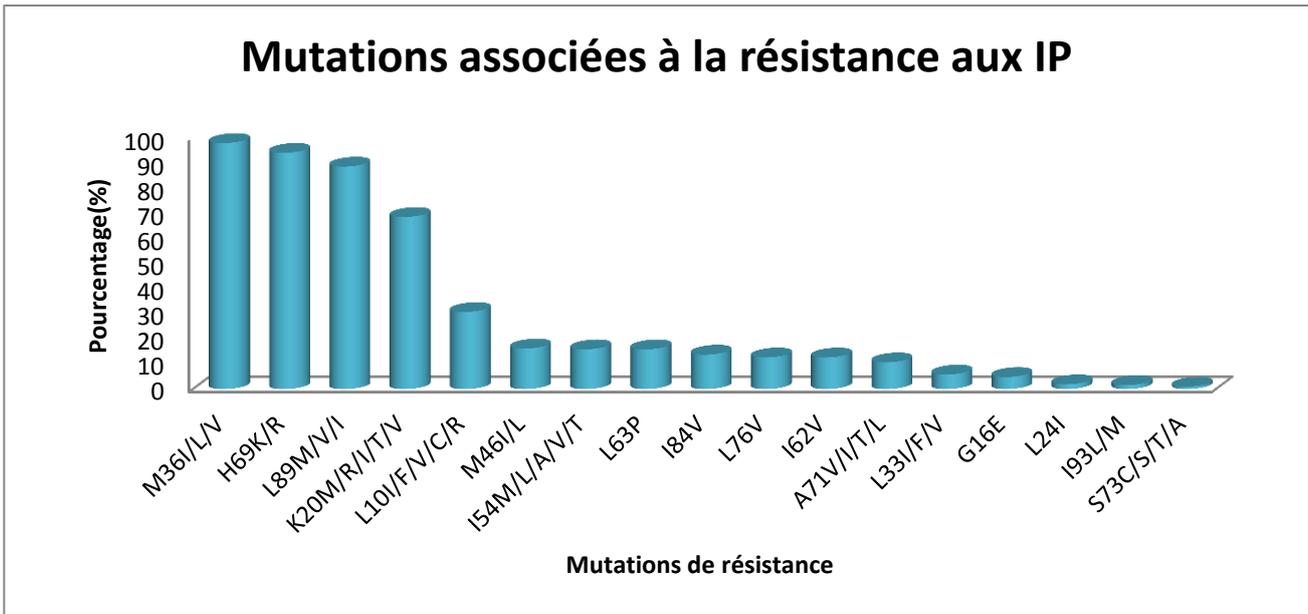
Les mutations de résistance associées aux INNTI avaient différents scénarii : 22,98% des patients portaient des mutations Y181C/I/V conférant de la résistance à l'ensemble des INNTI, suivi de la mutation K103N conférant de la résistance à l'EFV et à la NVP.



**Figure 13 :** Fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux INNTI.

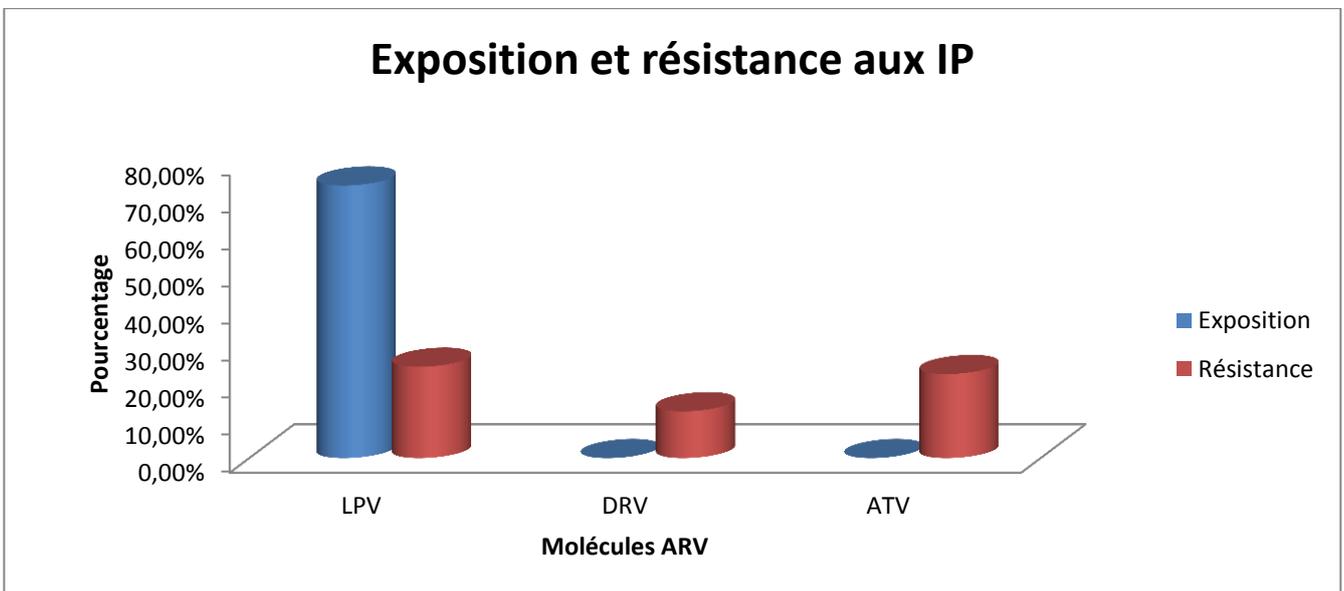
La résistance de l'exposition par rapport à la résistance aux INNTI se présentait comme suit : 71,84% ont été exposés à la NVP avec 56,63% de résistance et 15,86% des patients ont reçu l'EFV avec 53,72% de résistance. Trente-trois virgule zéro un pourcent et 2,91% étaient résistants à l'ETR et à la RPV respectivement avec 0% d'exposition à ces molécules.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.



**Figure 14 :** Fréquence associée à la mutation aux IP.

Concernant les mutations de résistance associée aux IP la plus part des patients étaient les mutations : M36I/L/V chez 98,06%, H69K/R/Q chez 94,17%, L89M/V/I chez 88,67% qui sont toutes des mutations mineures ou polymorphiques.



**Figure 15:** Fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux IP.

Et la fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux IP se présentait comme suit : 73,46% ont été exposés à la LPV avec 24,60% de résistance. Aucun patient n'a été exposé à l'ATV et au DRV mais respectivement avec 22,65% et 12,62% de résistance

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

### 5.7. Croisements statistiques des différents paramètres chez nos patients.

**Tableau XXII** : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale plasmatique

CV (cp/ml)	1000-5000		5000-100000		>100000		Total	P value	
<b>Molécules</b>	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	
<b>ABC</b>	34	11,45	54	9,31	54	9,23	142	9,71	0.912
<b>AZT</b>	27	9,09	50	8,62	48	8,21	125	8,55	0.989
<b>DDI</b>	27	9,09	45	7,76	50	8,55	122	8,34	0.969
<b>FTC/3TC</b>	45	15,15	78	13,45	80	13,68	203	13,89	0.914
<b>D4T</b>	29	9,76	55	9,48	50	8,55	134	9,17	0.939
<b>TDF</b>	21	7,07	39	6,72	39	6,67	99	6,77	0.898
<b>NPV</b>	33	11,11	72	12,41	70	11,97	175	11,97	0.981
<b>EFV</b>	31	10,44	71	12,24	64	10,94	166	11,35	0.897
<b>ETR</b>	19	6,40	43	7,41	40	6,84	102	6,98	0.950
<b>RPV</b>	1	0,34	5	0,86	3	0,51	9	0,62	NA
<b>LPV</b>	13	4,38	29	5,00	34	5,81	76	5,20	NA
<b>DRV</b>	5	1,68	15	2,59	19	3,23	39	2,66	NA
<b>ATV</b>	12	4,04	24	4,15	34	5,81	70	4,79	NA
<b>Total</b>	297	100,00	580	100,00	585	100,00	1462	100,00	

Les valeurs de P value n'ont pas été statistiquement significatives.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Tableau XXIII** : Croisement statistique de la résistance aux ARV selon la durée du traitement ARV

<b>Durée du traitement</b>		<b>≤ 3 ans</b>		<b>4-5 ans</b>		<b>≥ 6 ans</b>		<b>Total</b>	<b>P value</b>
<b>ARV (année)</b>									
<b>Molécules</b>	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	
<b>ABC</b>	40	9,62	69	9,94	33	9,38	142	9,71	0.986
<b>AZT</b>	32	7,69	63	9,08	30	8,52	125	8,55	0.838
<b>DDI</b>	30	7,21	63	9,08	29	8,24	122	8,34	0.858
<b>FTC/3TC</b>	61	14,66	95	13,69	47	13,35	203	13,89	0.956
<b>D4T</b>	35	8,41	67	9,65	32	9,09	134	9,17	0.993
<b>TDF</b>	25	6,01	49	7,06	25	7,10	99	6,77	0.936
<b>NPV</b>	61	14,66	72	10,37	42	11,93	175	11,97	0.673
<b>EFV</b>	58	13,94	67	9,65	41	11,65	166	11,35	0.688
<b>ETR</b>	30	7,21	46	6,63	26	7,39	102	6,98	0.981
<b>RPV</b>	4	0,96	2	0,29	3	0,85	9	0,62	NA
<b>LPV</b>	16	3,85	42	6,05	18	5,11	76	5,20	0.973
<b>DRV</b>	9	2,16	20	2,89	10	2,84	39	2,66	NA
<b>ATV</b>	15	3,62	39	5,62	16	4,55	70	4,79	NA
<b>Total</b>	416	100,00	694	100,00	352	100,00	1462	100,00	

Les valeurs de P value n'ont pas été statistiquement significatives.

## **6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :**

### **6.1. Limites de notre étude :**

Dans notre étude nous nous sommes basés uniquement sur la mesure de la charge virale et les données biologiques recueillies sur les dossiers sans avoir les informations sur les infections opportunistes et sans mesurer l'observance aux traitements ARV chez nos patients qui pourraient expliquer les taux bas de LTCD4. Le but de l'étude était d'évaluer la prévalence de la résistance aux ARV chez les patients infectés par le VIH-1 sous traitement ARV en échec virologique de deuxième ligne à Bamako. Les charges virales  $>$  à 100000 étaient probablement en rapport avec une inobservance ou un arrêt de traitement.

### **6.2. La technique utilisée :**

Les tests génotypiques de résistance sont très importants dans la gestion optimale des traitements ARV, le choix des meilleurs traitements de relais et la limitation du développement de la multi résistance. La PCR utile pour l'analyse des polymorphismes de taille, reste toutefois limitée pour l'exploration des micros hétérogénéités de taille et de séquence. Nous avons de ce faite utilisé le séquençage et les outils bioinformatiques d'analyse des séquences d'ADN dans notre démarche méthodologique afin de mieux apprécier la diversité génétique et les mutations sur le gène pol, comme la TI et la protéase, dont les rôles sont essentiels dans le traitement ARV.

Le kit viroseq® HIV-1 genotyping system v2.5 a été utilisé pour l'analyse des séquences du gène pol du VIH 1. Ce kit est prêt pour l'emploi et contient tous les réactifs nécessaires à l'extraction et à la réaction de séquençage. Ceci explique notre choix de ce kit. Mais une technique maison s'avère nécessaire vu le coût des techniques avec les kits commerciaux et aussi vu la diversité génétique étendue du VIH, il serait intéressant d'avoir des primers très spécifiques aux souches circulantes au Mali qui sont bien connues. Il est important de rappeler que cette technique viroseq a été mise au point pour le sous-type B qui est le sous-type prédominant en Europe et aux Etats-Unis. Le site ([www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi](http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi)) a été utilisé pour identifier les sous-types de VIH-1 rencontrés chez nos patients.

### **6.3. Données démographiques et biologiques :**

Les femmes représentaient 73,46% de notre population d'étude. Ceci confirme la féminisation de l'infection à VIH en Afrique et particulièrement au Mali à Bamako où les femmes représentent 1,7% du taux d'infection(4).

Ce résultat est en concordance avec ceux de Maiga et al au Mali en 2012 et de Boender et al en 2016 dans une étude en Afrique subsaharienne où les taux de prévalence de l'infection à VIH-1 chez les femmes étaient de 67% et 50,7% respectivement(7,8)

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

La tranche d'âge de 30-39 ans était la plus représentée avec 42,39% des patients. L'âge médian était de 35 ans avec des extrêmes de 18 et 70 ans. Ce résultat est comparable à celui de l'étude réalisée sur les patients en échec de 2<sup>ème</sup> ligne en 2012 au Mali où Maiga et al ont trouvé 35 ans comme âge médian(8).

Une étude réalisée en Afrique subsaharienne en 2016 par Boender et al ont rapporté une médiane d'âge de 38,3 ans, et 37 ans comme âge médian en Afrique du sud dans une étude réalisée en 2017 par Etta et al. Ces résultats montrent que l'infection à VIH touche de façon prédominante la population jeune sexuellement active(7,67)

Par rapport aux taux de lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, 51,78% de nos patients avaient un taux de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> inférieur à 350 cellules/mm<sup>3</sup>. La médiane des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était de 193 cellules/mm<sup>3</sup> avec des extrêmes de 2 et 1660 cellules/mm<sup>3</sup>. Concernant les charges virales, 42,07% de nos patients avaient une charge virale plasmatique  $\geq$  à 100000 copies/ml. La médiane de la charge virale était de 57086 copies/ml avec des extrêmes de 1040 et 2000000 copies/ml. Nos patients étaient en déficit immunitaire modéré. Les charges virales plasmatiques étaient très élevées ceci pourrait s'expliquer par une mauvaise adhérence aux traitements antirétroviraux, un arrêt de traitement ou une accumulation de mutations de résistance due à la longue durée sous traitement sans surveillance virologique.

Ces résultats sont comparés à ceux Boender et al qui ont rapportés dans leur étude en 2016 une fréquence de 49,6% des patients qui avaient un taux de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> < 200 cellules/mm<sup>3</sup> et 80,4% des patients avaient une charge virale plasmatique  $\geq$  à 1000 copies/ml avec une médiane de CV à 4,2 log copies/ml(7).

Environ 45,95% de nos patients étaient dans une tranche de durée de traitement sous ARV de quatre à cinq ans avec une médiane de durée de traitement sous ARV de quatre(4) ans et des extrêmes deux(2) et treize(13) ans et 48,54% étaient dans la même classe de durée de traitement sous ARV de la famille des INTI.

Par rapport à la durée de traitement sous ARV des familles : Les INNTI et les IP avec respectivement 83,50% et 82,20% de nos patients avaient une période de traitement inférieure égale à trois ans et des médianes successives de périodes de traitement de deux ans.

Nos patients avaient une expérience sous traitement ARV supérieure à ceux de Thiam et al au Sénégal dans une étude en 2013 et inférieur à ceux de Guichet et al dans une étude en 2016 menée au Burkina Faso, au Cameroun et au Sénégal où ils ont trouvé des médianes de période sous traitement ARV de 3,3 et 4,08 ans respectivement(68,69).

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

Environ 62,46% de nos patients étaient exposés à six molécules d'ARV disponibles au Mali, 49,19% étaient exposés à quatre molécules de la famille des INTI, 83,50% étaient exposés à une molécule de la famille des INNTI, 86,41% étaient exposés à une molécule de la famille des IP.

#### **6.4. Diversité génétique et sous-type de VIH-1:**

Le recombinant CRF02\_AG était le plus prédominant dans notre population d'étude soit 71% suivi de CRF06\_cpx soit 12%. En outre de ces deux, les sous-types CRF01\_AE, CRF09\_cpx, CRF19\_cpx, A1, C, F1, F2, G, et URF ont été aussi rapportés chez nos patients, qui confirme l'étude réalisée au Mali par Maiga et al en 2012 qui ont montré que le recombinant CRF02\_AG était le sous type le plus prédominant soit 67% (8).

Ces résultats confirment les études réalisées en Afrique de l'Ouest qui ont trouvé que ce recombinant était prédominant dans cette région Africaine. Le recombinant CRF02\_AG est aussi prévalent au Cameroun(70).

#### **6.5. Prévalence des mutations de résistance :**

La prévalence de la résistance par classe thérapeutique était : 65,37% de résistance à au moins un INTI, 61,49% de résistance à au moins un INNTI et 38,19% de résistance à au moins IP.

Ces différences de prévalence entre les inhibiteurs non nucléosidique et nucléotidique de la transcriptase inverse et les IP pourraient s'expliquer d'une part par le fait que les IP sont très peu utilisés en première intention et d'autre part par leur forte barrière génétique à la résistance. On sait aujourd'hui que la résistance aux IP est associée à une accumulation de mutation de résistance.

Il faut plusieurs mutations pour rendre résistant un IP comme le LPV utilisé dans nos recommandations nationales en deuxième ligne(47).

Une étude réalisée en 2017 par Etta et al en Afrique du sud, ont rapporté 60,8% de résistance aux INTI, 65,2% de résistance aux INNTI et 5,8% de résistance aux IP(67).

Ces résultats suggèrent une surveillance régulière de la charge virale plasmatique et en cas d'échec de mettre beaucoup l'accent sur l'observance afin de limiter l'accumulation de mutations de résistance chez les patients prenant des molécules dont la barrière génétique est faible à la résistance.

##### **6.5.1. Prévalence des mutations de résistance aux INTI :**

Nous avons observé dans notre étude 65,37% de résistance à au moins un INTI. La mutation M184V conférant principalement de la résistance aux molécules 3TC, FTC et secondairement à l'ABC était la plus fréquente avec 61,81% des cas.

Dans l'étude de l'Afrique du sud, ils ont rapporté que, la mutation M184V était la plus fréquente avec 51,7% des cas(67).

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

La mutation M41L a été identifiée chez 22,01% des patients, la K65R chez 2,27%, la K70E/R chez 21,68%, la L210W chez 11,00%, la T215F/Y chez 34,63%, la K219Q/E chez 13,27% des cas.

Comparer aux mutations retrouvées chez les ougandais dans une étude menée par Namakoola et al en 2016, M184V avec 20,7%, K65R avec 8%, M41L et K70R avec 8%(71).

Le complexe Q151M rendant une multirésistance à tous les inhibiteurs nucléosidiques de la TI sauf au TDF (qui est un inhibiteur nucléotidique) a été identifié chez nos patients avec une prévalence de 4,53%. Cependant aucun patient ne portait une insertion au codon 69 entraînant une multirésistance à tous les INTI, inclut le TDF.

### **6.5.2. Prévalence de l'exposition par rapport à la résistance aux INTI.**

Pour l'ABC, il y avait 66,99% d'exposition contre 45,95% de résistance, l'AZT 41,10% d'exposition contre 40,45% de résistance, la DDI 47,57% d'exposition contre 39,48% de résistance, le FTC/3TC 100% d'exposition contre 65,70% de résistance, et le TDF 37,22% d'exposition contre 32,04% de résistance, tandis que Maiga et al au Mali en 2102 ont trouvé les résultats suivants : 80% d'exposition à l'ABC contre 48% de résistance, pour l'AZT 51% d'exposition contre 40% de résistance, la DDI 57% d'exposition contre 42% de résistance, le FTC/3TC 100% d'exposition contre 66% de résistance, et le TDF 25% d'exposition contre 33% de résistance(8).

### **6.5.3. Prévalence des mutations de résistance aux INNTI :**

Une prévalence élevée de la résistance aux INNTI a été retrouvée dans notre étude : 56,63% de résistance à la NVP, 53,72% de résistance à l'EFV (INNTI de première génération) et 33,01% de résistance à l'ETR, 2,91% de résistance à la RPV (INNTI de seconde génération). Ces résultats supportent les études qui ont montré que la prévalence de la résistance aux INNTI de première génération était élevée en Afrique et pourrait compromettre l'usage de l'etravirine dans ces pays(72).

Trente-huit pourcent de résistance à l'ETR a été retrouvé chez les patients en échec de deuxième ligne au Mali(8). Une autre étude menée au Mali a aussi rapporté que parmi les 320 patients en échecs à la NVP ou à l'EFV, 22 et 29% était résistance à l'ETR et la RPV respectivement(73).

Les mutations de résistance associées aux INNTI avaient différent scénarii : 22,98% des patients portaient des mutations Y181C/I/V conférant de la résistance à l'ensemble des INNTI, suivi de la mutation K103N conférant de la résistance à l'EFV et à la NVP soit 20,71%. D'autres mutations ont été trouvées chez nos patients telles que : G190A/S chez 9,06%, Y188L chez 5,56%, la P225H chez 1,94%, la V179D chez 4,53%, la E138A/K chez 3,88%.

La mutation E138A/K rendant résistance à la RPV avait une prévalence de 3,88% dans notre population d'étude. Cela pourrait expliquer la forte prévalence de la RPV par rapport à l'ETR.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

D'autres études précédentes au Mali, au Cameroun et en Malawi ont rapporté une prévalence nulle de cette mutation(8,70,74).

#### **6.5.4. Prévalence de la résistance par rapport à l'exposition aux INNTI :**

La résistance de l'exposition par rapport à la résistance aux INNTI se présentait comme suit : 71,84% ont été exposés à la NVP avec 56,63% de résistance et 15,86% des patients ont reçu l'EFV avec 53,72% de résistance. 33,01% et 2,91% étaient résistants à l'ETR et à la RPV. Cependant aucun patient n'a été exposé à ses molécules respectives. Ces résultats confirment bien une forte résistance croisée entre les INNTI de première génération et de deuxième génération.

#### **6.5.5. Prévalence de la résistance aux IP :**

Nous avons observé une prévalence de la résistance aux IP (38,19%) dans notre population d'étude. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les IP sont majoritairement utilisés en deuxième ligne de traitement. Maiga et al dans leur étude sur les patients en échec de deuxième ligne ont rapporté 28% de résistance aux IP(8).

Les mutations associées aux IP rencontrées chez nos patients étaient : la K20M/R chez 68,61%, la L33I/L/V chez 5,83%, la G16E chez 4,85 %, la L63P chez 15,86 %, la H69K/R/Q chez 94,17%, la M36I/L/V chez 98,06 %, la L89M/V/I chez 88,67 % qui sont tous des mutations mineures ou polymorphiques.

La fréquence de l'exposition par rapport à la résistance aux IP se présentait comme suit : 73,46% ont été exposés à la LPV avec 24,60% de résistance. Aucun patient n'a été exposé à l'ATV et au DRV mais respectivement avec 22,65% et 12,62% de résistance. Cela pourrait également expliquer une résistance croisée entre les IP.

#### **6.5.6. Croisement statistique de la résistance du VIH-1 aux ARV en fonction de la charge virale.**

Dans notre étude aucune valeur de **P** n'a pas été statistiquement significative pour savoir si la résistance du VIH-1 aux ARV était liée à l'augmentation de la charge virale comparée à une étude en Afrique du Sud qui a rapporté qu'une CV plasmatique > 1000 copies/ml pourrait compromettre l'efficacité du traitement de seconde ligne(75)

#### **6.5.7. Croisement statistique de la résistance du VIH-1 aux ARV en fonction de la durée du traitement.**

Parmi les valeurs de **P** aucune n'a pas été statistiquement significative pour connaître si la résistance du VIH-1 aux ARV était associée à la durée du traitement contrairement à l'étude de l'Afrique du Sud qui montre un lien(75).

## 7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS:

### 7.1. Conclusion

Dans les pays en développement où les sous-types non B sont prédominants, la thérapie antirétrovirale (TAR) est devenue de plus en plus disponible, ce qui améliore la santé et la survie des patients infectés par le VIH-1. L'émergence de la résistance au VIH, due à des mutations dans les gènes de la protéase virale et de la transcriptase inverse (RT), est l'une des principales causes de l'échec du traitement antirétroviral.

La présente étude a porté sur des patients infectés par le VIH-1 et en échec virologique de leurs traitements antirétroviraux de deuxième ligne à Bamako.

Les génotypes de résistances ont été réalisés par un séquenceur (ABI 3130, Applied Biosystems) en utilisant un kit prêt à l'emploi qui est la technique viroseq et une technique de l'ANRS aussi utilisée.

La majorité de nos patients était des femmes soit 73,46%, et 42,39% des patients étaient dans la tranche d'âge de 30-39 ans avec une médiane d'âge de 35 ans. Le recombinant CRF02\_AG était le sous-type prédominant soit 71%, suivi du CRF06\_cpx soit 12%.

Nos patients avaient une durée moyenne de 4,5 ans sous traitement ARV. La moyenne des CV plasmatique et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était de 184726 copies/ml et 291,5 cellules/mm<sup>3</sup> respectivement.

La prévalence de la résistance par classe thérapeutique était : 65,37% de résistance à au moins un INTI, 61,49% de résistance à au moins un INNTI et 38,19% de résistance à au moins un IP.

Nous avons observé de la résistance de façon spécifique aux FTC/3TC (65,70%), à la NVP (56,63%), l'EFV (53,72%), et le LPV/r (24,60). Dans l'étude les valeurs de P value n'ont pas été statistiquement significatives pour savoir la relation entre la charge virale et la résistance aux ARV, la relation entre la durée du traitement et la résistance aux ARV.

## 7.2. **Recommandations :**

Au terme de cette étude et au vu des résultats obtenus, nous formulons les recommandations suivantes

### ✓ **Aux cliniciens :**

- Un meilleur suivi des patients sur le plan clinique et biologique,
- Donner des renseignements cliniques suffisants sur les fiches de demande de charge virale et de génotypage pour une meilleure interprétation des résultats.

### ✓ **Aux pharmaciens et biologistes:**

- Un renforcement de l'éducation thérapeutique pour une meilleure prise de conscience des patients en vue d'améliorer l'adhérence aux traitements,
- De rendre les résultats des patients le plus tôt que possible en vue d'une éventuelle prise de décision rapide,
- De sensibiliser les médecins pour renforcer l'observance aux traitements antirétroviraux et changer de traitement dès que les patients présentent un échec virologique.

### ✓ **A la Cellule Sectorielle de Lutte contre le Sida (CSLS):**

- Assurer la disponibilité constante des mesures de charge virale en approvisionnant régulièrement les laboratoires en réactifs et consommables,
- Assurer la maintenance des appareils,
- Identifier un laboratoire de référence pour la réalisation des CV même en cas de rupture dans les autres sites,
- Assurer l'accès des tests de génotypage aux patients en échec virologique de leurs traitements de première ligne et de deuxième ligne pour prévenir l'apparition des virus multi-résistants,
- Donner l'accès aux traitements de troisième ligne pour les pays à ressources limités comme le Mali.

### ✓ **Aux autorités sanitaires et administratives**

- Rendre les moyens disponibles (ressources humaines, matérielles, et financières) pour la continuité des tests de génotypage.
- Faciliter l'accès des tests de génotypage aux patients en échec virologique de leur traitement de deuxième ligne comme se fait dans les pays développés pour prévenir la sélection des virus multi-résistants.
- Recrutement des éducateurs thérapeutiques et des psychologues.

### ✓ **Aux partenaires techniques et financiers :**

Appuyer les laboratoires et les institutions de recherche par :

- La formation continue du personnel,
- La mise en place de contrôle interne et externe de qualité.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

✓ **Aux personnes vivant avec le VIH/SIDA :**

-Etre adhérent aux traitements pour un meilleur succès thérapeutique

## 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. OMS : VIH/sida [Internet]. WHO. [cité 20 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>
2. FLEURY H. J. A. Virologie humaine. 5 Ed. ELSEVIR/MASSON, 2009. 265 p.
3. L'ONUSIDA révèle que près de 21 millions de personnes séropositives sont désormais sous traitement [Internet]. [cité 20 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.unaids.org/fr/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2017>
4. Mali Enquête Démographique et de Santé (EDSM V) 2012-2013 [FR286] - FR286.pdf [Internet]. [cité 3 août 2017]. Disponible sur: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR286/FR286.pdf>
5. Fiche d'information — Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de sida [Internet]. [cité 19 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>
6. 90-90-90: Une cible ambitieuse de traitement pour aider à mettre fin à l'épidémie du sida | ONUSIDA [Internet]. [cité 7 août 2017]. Disponible sur: <http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2014/90-90-90>
7. Boender TS, Hamers RL, Ondoa P, Wellington M, Chimbetete C, Siwale M, et al. Protease Inhibitor Resistance in the First 3 Years of Second-Line Antiretroviral Therapy for HIV-1 in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* 2016; 214(6):873-83.
8. Maiga AI, Fofana DB, Cisse M, Diallo F, Maiga MY, Traore HA, et al. Characterization of HIV-1 antiretroviral drug resistance after second-line treatment failure in Mali, a limited-resources setting. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(12):2943-8.
9. Jean Marie Huraux, Jean Claude Nicolas, Henri Agut, Héléne PEIGUE-LAFEUILLE. *Traité de Virologie Médicale*. ESTEM. Paris, 2003. 699 p.
10. Retrovirus HIV [Internet]. [cité 24 avr 2018]. Disponible sur: [http://www.perrin33.com/virologie/cycles/hiv\\_1.php](http://www.perrin33.com/virologie/cycles/hiv_1.php)
11. 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. *Virologie* 2010; 14(2):119-28.

12. Robert R. Sokal and F. James Rohlf Biometry :the principles and Practice of Statistics in Biological Resarch. 3 nd Edition. New York, 1995. 887 p.
13. L'INFECTION à VIH : ASPECTS VIROLOGIQUES [Internet]. [cité 10 août 2017]. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/vih.html>
14. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, et al. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. EMBO J 2007; 26(12):3025-37.
15. Bukrinskaya AG. HIV-1 assembly and maturation. Arch Virol 2004; 149(6):1067-82.
16. Le virus du SIDA [Internet]. Planet-Vie. [cité 25 avr 2018]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/article/1463/virus-sida>
17. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. N Engl J Med 2011; 364(20):1943-54.
18. Module1FRv2.pdf [Internet]. [cité 10 août 2017]. Disponible sur: <https://www.fip.org/files/fip/HIV/french/Module1FRv2.pdf>
19. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. J Pathol 2008; 214(2):231-41.
20. Autotest de dépistage du VIH (ADVIH) - ppt télécharger [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: <http://slideplayer.fr/slide/12014539/>
21. Pnads111.pdf [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/Pnads111.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnads111.pdf)
22. 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.
23. Bocket L, Cheret A, Deuffic-Burban S, Choisy P, Gerard Y, De La Tribonniere X, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. Antivir Ther 2005; 10(2):247-54.

24. Brenner BG, Routy J-P, Petrella M, Moisi D, Oliveira M, Detorio M, et al. Persistence and Fitness of Multidrug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Acquired in Primary Infection. *J Virol* 2002; 76(4):1753-61.
25. Ayouba A, Akoua-Koffi C, Calvignac-Spencer S, Esteban A, Locatelli S, Li H, et al. Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS Lond Engl* 2013; 27(15):2488-91.
26. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs) [Internet]. [cité 10 août 2017]. Disponible sur: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
27. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, et al. Hiv-2 Crf01\_ab: First Circulating Recombinant Form of Hiv-2. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(3):241-7.
28. Une souche du VIH, qu'on pensait disparue, a infecté de nouveau [Internet]. [cité 25 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/medecine-souche-vih-quon-pensait-disparue-infecte-nouveau-34865/>
29. COULIBALY K. GENOTYPAGE ET EXPLORATION DU POLYMORPHISME NUCLEOTIDIQUE DE CCR5 RECEPTEUR DE CHIMIOKINES ET CORECEPTEUR MAJEUR DU VIH A BAMAKO. Thèse, Med, Bamako, 2006; 05-M-38.
30. Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. HIV genetic diversity and its consequences. *Pathol Biol* 2009; 57(2):142-8.
31. 36,7 millions de personnes vivent avec le VIH, 18,2 millions sont sous traitement | Vih.org [Internet]. [cité 25 avr 2018]. Disponible sur: <http://vih.org/20161201/367-millions-personnes-vivent-vih-182-millions-sont-sous-traitement/138798>
32. GIRARD P-M, KATLAMA C, PIALOUX G. VIH. Edition 2011. Doin, 2011. 839 p.
33. DOLO O. RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX CHEZ LES ENFANTS ET ADOLESCENTS INFECTES PAR LE VIH SUIVI AU SERVICE DE PEDIATRIE DU CHU GABRIEL TOURE. Thèse, Pharm, Bamako, 2014;
34. BIOINFORMATIQUE STRUCTURALE [Internet]. [cité 14 août 2017]. Disponible sur: <http://perso.ibcp.fr/gilbert.deleage/Cours/BIS.pdf>

35. Sluis-Cremer N, Arion D, Parniak\* MA. Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Cell Mol Life Sci CMLS* 2000; 57(10):1408-22.
36. Pohlmann S, Doms RW. Evaluation of Current Approaches to Inhibit HIV Entry. *Curr Drug Targets - Infect Disord* 2002; 2(1):9-16.
37. Grivel J-C, Shattock RJ, Margolis LB. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med* 2011; 9(1):1-6.
38. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(2):333-40.
39. Lataillade M, Kozal MJ. The Hunt for HIV-1 Integrase Inhibitors. *AIDS Patient Care STDs* 2006; 20(7):489-501.
40. Le bictégravir : un nouvel inhibiteur de l'intégrase [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.catie.ca/fr/traitementactualites/traitementactualites-220/agents-anti-vih/bictegravir-nouvel-inhibiteur-integras>
41. La doravirine contre le darunavir [Internet]. [cité 24 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.catie.ca/fr/traitementactualites/traitementactualites-220/agents-anti-vih/doravirine-contre-darunavir>
42. Donnell D, Baeten JM, Kiarie J, Thomas KK, Stevens W, Cohen CR, et al. Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. *Lancet Lond Engl* 2010; 375(9731):2092-8.
43. OMS : Traiter toutes les personnes vivant avec le VIH [Internet]. WHO. [cité 22 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/entity/mediacentre/news/releases/2015/hiv-treat-all-recommendation/fr/>
44. Politique et protocoles de prise en charge antiretrovirale du VIH et du Sida décembre 2013 - MaliARTguidelines2013.pdf [Internet]. [cité 15 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.hivpolicywatch.org/duremaps/data/guidelines/MaliARTguidelines2013.pdf>
45. experts-vih\_echec.pdf [Internet]. [cité 1 mars 2018]. Disponible sur: [https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih\\_echec.pdf](https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_echec.pdf)

46. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 1989; 243(4899):1731-4.
47. Yéni P. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Paris, 2010. 32-60 p.
48. experts-vih\_resistance.pdf [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: [https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/02/experts-vih\\_resistance.pdf](https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/02/experts-vih_resistance.pdf)
49. Picard V, Angelini E, Maillard A, Race E, Clavel F, Chêne G, et al. Comparison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with stavudine and didanosine or zidovudine and lamivudine. *J Infect Dis* 2001; 184(6):781-4.
50. Calvez V, Costagliola D, Descamps D, Yvon A, Collin G, Cécile A, et al. Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial. *Antivir Ther* 2002; 7(3):211-8.
51. Götte M, Arion D, Parniak MA, Wainberg MA. The M184V Mutation in the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Impairs Rescue of Chain-Terminated DNA Synthesis. *J Virol* 2000; 74(8):3579-85.
52. Tambuyzer L, Vingerhoets J, Azijn H, Daems B, Nijs S, de Béthune M-P, et al. Characterization of genotypic and phenotypic changes in HIV-1-infected patients with virologic failure on an etravirine-containing regimen in the DUET-1 and DUET-2 clinical studies. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26(11):1197-205.
53. Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, Béthune M-P de, Kraus G, Boven K, et al. TMC278, a Next-Generation Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI), Active against Wild-Type and NNRTI-Resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(2):718-27.
54. Marcelin A-G, Flandre P, Descamps D, Morand-Joubert L, Charpentier C, Izopet J, et al. Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1):72-7.
55. von Wyl V, Yerly S, Böni J, Bürgisser P, Klimkait T, Battegay M, et al. Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combination antiretroviral treatment: a comparison of different regimen types. *Arch Intern Med* 2007; 167(16):1782-90.

56. Faculty of Medicine and Health Sciences, Brest - ppt télécharger [Internet]. [cité 16 août 2017]. Disponible sur: <http://slideplayer.fr/slide/505851/>
57. Dando TM, Perry CM. Enfuvirtide. *Drugs* 2003; 63(24):2755-66.
58. Moore JP, Kuritzkes DR. A pièce de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4(2):118-24.
59. Cooper DA, Heera J, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, et al. Maraviroc versus Efavirenz, Both in Combination with Zidovudine-Lamivudine, for the Treatment of Antiretroviral-Naive Subjects with CCR5-tropic HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 2010; 201(6):803-16.
60. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, S E, et al. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2010; 47(2):126-30.
61. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage - ProQuest [Internet]. Disponible sur: <https://search.proquest.com/openview/ac876e4c9531927af50e8026a40da2a9/1?pq-origsite=gscholar&cbl=47191>
62. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Encinas S, et al. Genotypic Prediction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF02-AG Tropism. *J Clin Microbiol* 2009; 47(7):2292-4.
63. Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M, et al. Loss of Raltegravir Susceptibility by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Conferred via Multiple Nonoverlapping Genetic Pathways. *J Virol* 2009; 83(22):11440-6.
64. 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.
65. Descamps D, Delaugerre C, Masquelier B, Ruffault A, Marcelin A-G, Izopet J, et al. Repeated HIV-1 resistance genotyping external quality assessments improve virology laboratory performance. *J Med Virol* 2006; 78(2):153-60.
66. Protocole génotypage de résistance du VIH-1 selon ANRS.docx.

67. Etta EM, Mavhandu L, Manhaeve C, McGonigle K, Jackson P, Rekosh D, et al. High level of HIV-1 drug resistance mutations in patients with unsuppressed viral loads in rural northern South Africa. *AIDS Res Ther* 2017; 14(1):1-12.
68. Thiam M, Diop-Ndiaye H, Diouf AD, Vidal N, Ndiaye O, Ndiaye I, et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. *J Clin Microbiol* 2013; 51(2):578-84.
69. Guichet E, Aghokeng A, Serrano L, Bado G, Toure-Kane C, Eymard-Duvernay S, et al. Short Communication: High Viral Load and Multidrug Resistance Due to Late Switch to Second-Line Regimens Could Be a Major Obstacle to Reach the 90-90-90 UNAIDS Objectives in Sub-Saharan Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016; 32(12):1159-62.
70. Aghokeng AF, Kouanfack C, Eymard-Duvernay S, Butel C, Edoul GE, Laurent C, et al. Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon. *J Int AIDS Soc* 2013; 16(1):1800-4.
71. Namakoola I, Kasamba I, Mayanja BN, Kazooba P, Lutaakome J, Lyagoba F, et al. From antiretroviral therapy access to provision of third line regimens: evidence of HIV Drug resistance mutations to first and second line regimens among Ugandan adults. *BMC Res Notes* 2016; 9(1):1-7.
72. Bunupuradah T, Ananworanich J, Chetchotisakd P, Kantipong P, Jirajariyavej S, Sirivichayakul S, et al. Etravirine and rilpivirine resistance in HIV-1 subtype CRF01\_AE-infected adults failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens. *Antivir Ther* 2011; 16(7):1113-21.
73. Almoustapha I Maiga, DAOU. F, Balde. A, Fofana D.B. IAS 2013 - Abstract Prevalence of rilpivirine and etravirine resistance mutations in HIV-1 non-B subtypes infected patients failing to non-nucleoside transcriptase inhibitor-based therapies in Mali [Internet]. [cité 26 janv 2018]. Disponible sur: <http://pag.ias2013.org/Abstracts.aspx?AID=2545>
74. Hosseinipour MC, van Oosterhout JJG, Weigel R, Phiri S, Kamwendo D, Parkin N, et al. The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl* 2009; 23(9):1127-34.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

75. Manasa J, Lessells RJ, Skingsley A, Naidu KK, Newell M-L, McGrath N, et al. High-levels of acquired drug resistance in adult patients failing first-line antiretroviral therapy in a rural HIV treatment programme in KwaZulu-Natal, South Africa. PloS One 2013; 8(8):721-52.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom : MAIGA**

**Prénom : Abdourhamane Alhousseini**

**Nationalité : Malienne**

**Numéro de téléphone : (+223) 77 88 18 52**

**E-mail : [abdourhaalhoussmaiga@gmail.com](mailto:abdourhaalhoussmaiga@gmail.com)**

**Titre de la thèse : «Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de 2<sup>ème</sup> ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali »**

**Année universitaire : 2017-2018**

**Ville de soutenance : Bamako**

**Pays d'origine : Mali**

**Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)**

**Secteur d'intérêt : Virologie, Microbiologie et infectiologie**

### **RESUME :**

**Introduction :** Malgré l'efficacité des traitements ARV, des échecs virologiques, et la résistance du VIH aux ARV peuvent survenir. Plus de 20 ans les patients étaient restés sous traitement ARV de 1<sup>ère</sup> ligne couplés à un manque de suivi virologique, un switch tardif en 2<sup>ème</sup> ligne, et une augmentation des échecs virologiques de 2<sup>ème</sup> ligne dans les pays à ressources limitées. Tous ceux-ci pourraient compromettre l'attente du dernier 90 % de l'objectif de l'ONUSIDA d'ici 2020 en Afrique subsaharienne particulièrement au Mali.

**Objectif :** Evaluer la prévalence des profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Méthode :** L'étude a concerné les patients infectés par le VIH-1 et en échec de leur traitement de 2<sup>ème</sup> ligne. Les patients provenaient des sites de prises en charge de Bamako de mars 2013 à décembre 2016. Il s'agissait de séquencer les gènes de la protéase et de la transcriptase inverse pour ce faire nous allons utiliser deux techniques (Maison et commerciale). Les résultats ont été interprétés avec les dernières versions de l'algorithme de l'ANRS et de Stanford.

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

**Résultats :** Nous avons inclus 309 patients en échec virologique ( $CV \geq 1000$  copies/ml). Dans notre étude nous avons observé une prédominance féminine de 74,46% de prévalence, l'âge médian était de 35 ans avec des extrêmes de 18 ans et 70 ans, la médiane de la charge virale était de 57086 copies/ml avec des extrêmes de 1040 copies/ml et 2000000 copies/ml, le taux de CD4 médian était de 194 cellules/mm<sup>3</sup> avec des extrêmes de 2 cellules/mm<sup>3</sup> et 1660 cellules/mm<sup>3</sup>. Le recombinant CRF02\_AG était le sous-type de VIH-1 le plus prédominant avec 71% de cas et 62,46% de nos patients était exposé à 6 molécules d'ARV. La prévalence de la résistance aux différentes classes d'ARV était comme suit : 65,37% de résistance aux INTI, avec comme mutation fréquente la M184V (61,81%) des patients, 61,49 de résistance aux INNTI, avec comme mutation principale Y181C/I/V (22,98%) des patients, et 38,19% de résistance aux IP avec comme mutation fréquente M36I/L/V (98,06%) des patients qui est une mutation mineure.

**Conclusion :** Ces données nous montrent une prévalence élevée de résistance aux IP, donc il serait important d'étendre le suivi des patients infectés par le VIH-1 par les tests de charge virale et de vulgariser les tests de génotypage de résistance aux patients sous traitement de deuxième ligne au long cours.

Ceci permettra de prévenir l'émergence de la résistance chez ces patients.

**Mots clés :** VIH-1, échec virologique, ARV de deuxième ligne, Profils de résistance, Mali

ABSTRACT:

**Introduction:** Despite the effectiveness of ARV treatments, virologic failures and HIV resistance to ARVs may occur. More than 20 years, patients remained on first-line ARV treatment coupled with a lack of virologic follow-up, a late switch in second line, and an increase in virologic failures of second line in resource-limited countries. All of these could jeopardize the wait for the last 90% of the UNAIDS target by 2020 in sub-Saharan Africa, particularly in Mali.

**Objective:** To evaluate the prevalence of ARV resistance patterns in HIV-1 infected patients with second-line virologic failure in 309 cases in Bamako, Mali.

**METHOD:** The study concerned HIV-1 infected patients who failed their second-line treatment. The patients came from Bamako sites from March 2013 to December 2016. Protease and reverse transcriptase genes have been sequenced by the commercial and in house methods. The results have compared to the latest versions of ANRS and Stanford algorithm to point out the resistance mutations.

**Results:** We included 309 patients who failed to their second line treatment ( $VL \geq 1000$  copies / ml). Female sex was predominant with 227/309, the median age was 35 years [18 and 70 years], the median of viral load was 57086 copies / ml [1040 and 2000000 copies / ml], the median of CD4 count was 194

Profils de résistance du traitement ARV chez les patients infectés par le VIH-1 en échec virologique de deuxième ligne à propos de 309 cas à Bamako au Mali.

cells / mm<sup>3</sup> [2 and 1660 cells / mm<sup>3</sup>]. The CRF02\_AG was the most predominant HIV-1 subtype with 71% of cases and 62.46% of our patients were exposed to last six ARV molecules. The prevalence of resistance to different classes of ARV was as follows: 65.37% to NRTI, with M184V (61.81%), 61.49 to NNRTI with Y181C / I / V (22.98%) the most prevalent mutation, and 38.19% to PI with M36I / L / V (98.06%) as a frequent mutation (minor mutation).

**Conclusion:** These data show a high prevalence of PI resistance, so it is important to extend the follow-up of HIV-1 infected patients with viral load tests and to popularize resistance genotyping tests to patients undergoing second-line treatment. Long line

**Key words:** HIV-1, virologic failure, second-line ARV, resistance patterns, Mali

## *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*