

SCIENTIFIQUE



U.S.T.T-B

Faculté de Pharmacie

Année : 2012- 2013

N°...../

TITRE :

**«Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés
par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après
au moins 36 mois»**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 2013

Devant la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

Par : M. Moussa DIAWARA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Professeur Souleymane DIALLO II
Membres : Docteur Jean Paul DEMBELE
Docteur Alpha HAIDARA
Co-directeur : Docteur Almoustapha Issiaka MAIGA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

DEDICACES

Je rends grâce,

- **A Allah : le Tout Puissant, le maitre 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 : feu Salim DIAWARA**

Cher Papa, tu as quitté ce monde ici bas quand je venais à peine de rentrer au collège, mais je me souviendrais de cet homme qui a su cultiver le sens de l'honneur, de la dignité, de la droiture, le sens du moral et du travail bien fait. 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 mère : Djeneba CAMARA**

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'aujourd'hui. Chère maman merci, merci pour l'éducation et l'amour reçus et tes prières sans cesse. 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.

REMERCIEMENTS

A l'endroit de ma famille :

Je remercie toute la famille DIAWARA de BADIOLA pour son soutien sans cesse.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à mes frères Seydou, Adama, Chaka qui n'ont ménagé aucun effort pour que nous arrivions à ce jour. Que la fraternité qui nous unit triomphe toujours et Dieu nous prête santé et longévité dans le bonheur.

Je remercie mes cadets Bamou, Aboubacar Sidiki ainsi que mes neveux de Bouaké, d'Abidjan et du Mali, que ce travail leurs sert d'exemple et les incite à mieux faire.

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

Au Dr Aliou BALDE, Dr BOCOUM Fatoumata DAOU Mlle Ban TRAORE pour votre apport si considérable dans la réalisation de ce travail et votre soutien sans faille,

Un immense merci au Dr Moumine SANOGO (qui fut pour moi un bon conseiller dans les moments difficiles) et pour son apport si considérable dans la réalisation de cette thèse, je

tiens à remercier Dr Yeya SARRO, Dr Amadou KONE, Dr Bassiro DIARRA, M Brahim KONE ainsi que tout le personnel de SEREFO pour son soutien 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 l'Union des Etudiants Ressortissants et Sympathisants de Bougouni (URSB) et à l'Association des Etudiants Ressortissant de la troisième région et Sympathisants (ADERS), A mes camarades de promotion «Promotion Pr Souleymane Diallo» trouvez ici l'expression de ma profonde amitié,

A mes amis du quartier Namakan, Seydou, Souleymane, Salim, Alpha j'en passe merci pour votre amitié,

Au personnel du laboratoire d'analyse biomédical du CHU du point G, le personnel de l'INRSP de Bamako Coura, le personnel de la pharmacie hospitalière CHU Gabriel Touré, le personnel des Pharmacies Sabou.T Mariam Cisse et Tièba,

personnes vivant avec le VIH.

Merci à tous. Ce travail est le votre.

Hommages AUX Membres DU JURY

*A notre maître et président du jury
Professeur Souleymane DIALLO*

- Pharmacien biologiste des services de santé des armées*
- Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie*
- Ancien chef de service du laboratoire d'analyses médicales du CHU Gabriel TOURE*
- Ancien chef du département des services Médico-techniques du CHU Gabriel TOURE*
- Coordinateur du projet hygiène des mains et sécurité des patients au CHU Gabriel TOURE*
- Directeur général du centre d'infectiologie Charles Mérieux*

Cher Maître,

Vous nous faites un privilège et un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Homme de sciences réputé et admiré par tous, nous avons été impressionnés par votre simplicité, votre grande disponibilité et votre amour du travail bien fait.

Nous avons suivi avec un grand intérêt vos enseignements de qualité et toujours d'actualités ;

Grande est notre fierté de compter parmi vos élèves.

Puisse Allah le Tout Miséricordieux vous rendre vos bienfaits et nous permettre de suivre vos pas.

A notre maître et juge

Docteur Jean Paul DEMBELLE

- *Médecin spécialiste des Maladies Infectieuses et Tropicales*
- *Praticien hospitalier au CHU du Point G*
- *Enseignant vacataire à la FMOS, USTTB*
- *Secrétaire aux relations extérieures et aux affaires sociales de la Société Malienne de Pathologies Infectieuses (SOMAPI)*
- *Membre de la société Africaine de Pathologies Infectieuses (SAPI)*

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous avons été touchés par votre simplicité et vos qualités intellectuelles qui font de vous un bon maître. Recevez ici l'expression de nos vifs remerciements et notre profond respect.

A notre maître et juge

Docteur Alpha HAIDARA

- *Pharmacien et PhD en virologie à l'Université de Montréal*
- *Praticien au Laboratoire National de la Santé (LNS)*

Cher Maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous avons été comblés par votre accueil et votre disponibilité dès notre première rencontre. Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rempli d'esprit de recherche.

Recevez ici cher maître l'expression de notre profonde considération.

A notre maître et co-directeur

Docteur Almoustapha Issiaka MAIGA

- *Pharmacien et PhD en virologie à l'école doctorale Complexité du vivant (EdV) de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris 6 à Paris*
- *Responsable de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV à SEREFO*
- *Chef de service du laboratoire d'analyses biomédicales du CHU Gabriel Touré.*

Cher Maître,

Vous nous faites un honneur en acceptant de co-diriger cette thèse.

Plus qu'initiateur de ce travail vous avez été pour nous un guide permanent.

C'est le lieu pour nous de vous témoigner toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous avons été fascinés par vos immenses qualités d'homme de sciences. Auprès de vous, nous avons appris la modestie, la patience, et l'amour de la recherche. Votre contact facile et votre sympathie nous ont beaucoup marqué.

Cher Maître, nous sommes fiers de faire partie de vos élèves.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- *PhD en parasitologie moléculaire,*
- *Responsable des cours de biologie moléculaire appliquée à la faculté des sciences techniques et de biologie animale à la faculté de pharmacie,*
- *Responsable du laboratoire de biologie moléculaire appliquée de la faculté des sciences techniques*
- *Directeur Adjoint du programme de recherche sur le VIH/Sida et la tuberculose*

Cher Maître,

Permettez nous de vous remercier pour la confiance que vous nous faites en acceptant de diriger ce travail.

Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rigoureux, appliqué et attaché au travail bien fait. Tout au long de cette thèse, nous avons été animés par le souci de produire un travail à la hauteur de vos attentes. Nous avons suivi avec un grand intérêt vos enseignements de qualité.

Cher maître veuillez accepter nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ABC : Abacavir**
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANRS : Agence National de Recherche sur le SIDA et les Hépatites
ARN : Acide Ribonucléique
APV : Amprénavir
ARV : Antirétroviraux
ATZ : Atazanavir
AZT: Zidovudine
CD: Cluster of Differentiation
CCR5 : Récepteurs de Chimiokines CCR5
CRF: Circulating Recombinant Form
CXCR5 : Récepteurs de Chimiokines CXCR5
d4T: Stavudine
ddI: Didanosine
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing nonintegrin
DRV: Darunavir
EFV: Efavirenz
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
env: Enveloppe
ETR : Etravirine
FTC : Emtricitabine
gag : group antigen
gp: glycoprotéine
HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy
IDV: Indinavir
IMAARV: Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux
INI : Inhibiteur d'Intégrase
INT : Inhibiteur Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
INNTI : Inhibiteur Non-Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
IP : Inhibiteur de Protéase
ISBS: Integrated Sexually transmitted diseases prevalence and Behavioral Survey in Mali

LPV: Lopinavir

LTR: Long Terminal Repeat

MVC: Maraviroc

Nef: «negative factor»

NVP: Nevirapine

ONUSIDA : Organisation des Nations Unies contre le SIDA

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pol: «polymerase»

PVVIH: Personne Vivant avec le Virus de l'immunodéficience Humaine

Rev: «regulator of virion expression»

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SQV : Saquinavir

SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquis

SIV : Simian Immunodeficiency Virus

3TC : Lamivudine

TAMs: Thymidine Analogue Mutations

Tat : proteine transactivatrice

TPV : Tipranavir

URF : Unique Recombinant Form

Vif : «viral infectivity factor»

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Abréviation des acides aminés :

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

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	1
2	OBJECTIFS.....	3
3	GENERALITES.....	4
	3.1 GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH/SIDA.....	4
	3.1.1 Définition, origine et historique de découverte du VIH/SIDA.....	4
	3.1.2 Epidémiologie.....	4
	3.1.3 Les rétrovirus.....	7
	3.1.4 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	9
	3.2 DIAGNOSTIQUE AU LABORATOIRE.....	21
	3.2.1 Diagnostique indirect.....	21
	3.2.2 Diagnostique direct.....	22
	3.2.3 Les outils bioinformatiques de l'analyse des séquences de l'ADN.....	25
	3.3 TRAITEMENT ET RESISTANCE AUX ARV.....	26
	3.3.1 Traitement.....	26
	3.3.2 Résistance du VIH aux ARV.....	34
4	METHODOLOGIE.....	45
	4.1 Cadre de l'étude.....	45
	4.2 Type et période d'étude.....	46
	4.3 Population d'étude.....	46
	4.4 Critères d'inclusion.....	46
	4.5 Critères de non inclusion.....	46
	4.6 Calcul de l'échantillonnage.....	46
	4.7 Méthodes utilisées.....	46
	4.7.1 Technique Abbott HIV-1 Réal Time™	47
	4.7.2 La technique viroseq™	51
	4.7.3 Prélèvement et stockage des échantillons.....	60
	4.8 Analyse des données.....	61
5	RESULTATS.....	62
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....	75
7	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	84
8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : classification CDC de l'infection à VIH pour les adultes et les adolescents > 15 ans (révision 1993).....	19
<u>Tableau II</u> : classification OMS de l'infection VIH pour les adultes et les adolescents > 15 ans (révision 2007).....	20
<u>Tableau III</u> : Sensibilité et spécificité de quelques trousse de quantification moléculaire de l'ARN du VIH-1.....	23
<u>Tableau IV</u> : Les alternatives de seconde ligne possibles en fonction des schémas utilisés en première ligne et cas de contre indication ou de toxicité de l'une des molécules du schéma préférentiel.....	31
<u>Tableau V</u> : Résumé des recommandations d'utilisation des tests de résistance.....	43
<u>Tableau VI</u> : Interprétation des résultats obtenus sur le m2000rt (protocole 1,0 et 0,6).....	51
<u>Tableau VII</u> : Répartition des patients en fonction de l'âge.....	62
<u>Tableau VIII</u> : Répartition des patients en fonction du service demandeur.....	63
<u>Tableau IX</u> : Répartition des patients en du taux de lymphocyte T CD4.....	63
<u>Tableau X</u> : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique.....	64
<u>Tableau XI</u> : Répartition conditionnelle de la charge virale plasmatique en fonction du taux de lymphocyte T CD4 chez les 92 patients.....	64
<u>Tableau XII</u> : Répartition des patients en fonction du traitement antirétroviral.....	65
<u>Tableau XIII</u> : Répartition des patients en fonction de la durée de traitement sous ARV...65	65
<u>Tableau XIV</u> : Répartition conditionnelle des traitements au moment du test de génotypage en fonction de la durée sous traitement des 92 patients.....	66
<u>Tableau XV</u> : répartition conditionnelle du nombre de mutations majeurs en fonction de la durée de traitement (pourcentage en ligne).....	67
<u>Tableau XVI</u> : Impact de l'élévation de la CV plasmatique sur la résistance aux ARV.....	71
<u>Tableau XVII</u> : Impact du taux de lymphocyte T CD4 sur la résistance aux ARV.....	72
<u>Tableau XVIII</u> : Impact de la longue durée sous traitement sur la résistance aux ARV.....	72
<u>Tableau XIX</u> : les facteurs associés au risque d'élévation de la charge virale plasmatique...73	73
<u>Tableau XX</u> : les facteurs associés au risque d'apparition des mutations de résistance (CV plasmatique ≥ 5000 copies/ml).....	73
<u>Tableau XXI</u> : Taux de lymphocyte T CD4 ≤ 350 cellules/mm ³ comme facteurs associés au risque d'apparition des mutations de résistance.....	74
<u>Tableau XXII</u> : la durée de traitement sous ARV > 36 mois comme facteurs associés au risque d'apparition des mutations de résistance.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les tendances mondiales en matière de VIH, 1999-2011.....	5
Figure 2 : Structure du VIH-1.....	9
Figure 3 : Structure génomique de l'ADN proviral du VIH-1.....	10
Figure 4 : Cycles de réplication des VIH.....	11
Figure 5 : Arbre phylogénétique des VIH.....	13
Figure 6 : Mécanisme de la recombinaison génétique.....	14
Figure 7 : distribution géographique des VIH-1 dans le monde.....	16
Figure 8 : Corécepteurs et tropismes des souches de VIH-1.....	17
Figure 9 : Evolution typique après infection par le VIH-1.....	18
Figure 10 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI.....	37
Figure 11 : Position des principales mutations de résistance aux IP.....	38
Figure 12 : Schéma de la méthodologie du génotypage	60
Figure 13 : Répartition des patients en fonction du sexe.....	62
Figure 14 : Répartition des patients en fonction des sous-types de VIH-1.....	68
Figure 15 : Fréquence des mutations associées aux INTI.....	68
Figure 16 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI.....	69
Figure 17 : Fréquence des mutations associées aux INNTI.....	69
Figure 18 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INNTI.....	70
Figure 19 : Fréquence des mutations associées aux IP.....	70
Figure 20 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux IP.....	71

1 INTRODUCTION

L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est loin d'être une maladie anecdotique ou en voie de disparition. Elle reste un problème de santé mondiale d'une portée sans précédent. Bien qu'il y ait des avancées considérables, elle figure parmi les causes premières de mortalités dans le monde (1).

Le VIH-1 a été isolé pour la première fois en 1983 dans le laboratoire de Luc Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris (2).

D'après le dernier rapport ONUSIDA 2012, 34 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde. L'Afrique subsaharienne représentait 69% (23,5 millions) des cas de VIH avec 1,7 million de personnes nouvellement infectées. Parmi elles, près de 330.000 (90% du total mondiale) étaient des enfants soit un recul de 26% du nombre d'enfants infectés depuis 2009. Dans la même région le nombre de décès dû au sida a diminué de 32% de 2005 à 2011.

Cependant 70% des décès y sont survenus en 2011 (1).

Selon l'Enquête Démographique et de Santé (EDS-IV) réalisée au Mali en 2006, la prévalence du VIH était estimée à 1,3% dans la population des hommes et des femmes de 15 à 49 ans contre 1,6% en 2006 faisant du Mali un pays à faible prévalence (3).

Après les premières tentatives de monothérapies à la zidovudine (AZT) sans succès, l'espoir dans le traitement antirétroviral (ARV) est né en 1996 avec l'avènement des HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) comprenant les nouvelles molécules telles que les inhibiteurs de la protéase (IP).

Ces molécules actives ont permis d'atteindre l'objectif du traitement antirétroviral, qui est de réduire au maximum la charge virale (< 50 copies/ml ou 20 copies/ml selon les seuils des techniques utilisées) afin d'arrêter la progression de l'infection, et de restaurer au mieux et le plus tôt les différentes fonctions immunitaires atteintes par le VIH (4).

Au Mali, l'Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux (IMAARV) conjuguée à la gratuité du traitement (Juillet 2004) a considérablement amélioré la vie des personnes vivant avec le VIH (PV VIH) grâce à l'élargissement de l'accès aux molécules d'ARV. Ainsi en Septembre 2012, 28 751 patients étaient sous traitement ARV avec comme régime de première intention 2 INTI + 1 INNTI ou 1 IP dans certain cas.

Un manque de suivi biologique des patients en particulier ; un déficit majeur d'utilisation en routine des outils immunovirologiques de monitoring, pourrait craindre l'émergence et le développement de la résistance aux ARV, qui est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, la gp41 ou de l'intégrase lorsque la réplication virale persiste en présence d'ARV (5).

Ces régimes de première intention, malgré leur efficacité après 6 mois de traitement, ont montré chez des patients en échec virologique précoce (charge virale >1000 copies/ml), des mutations de résistance dans 50% des cas (principalement M184V et Y181C) conférant de la résistance à la lamivudine (3TC) et aux inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI). Aucune mutation de résistance (TAMs) qui rendrait une multirésistance à cette classe d'INTI n'a été détectée (6)

Des études récentes menées au Mali et au Burkina ont montré sur une cohorte de plus de 800 patients avec une durée de 12 mois en moyenne de traitement ARV, que la prévalence des mutations de résistance appelées TAMs était de 32,6% (7).

En 2010 une étude similaire menée au Togo a montré une prévalence de la résistance à 24,5% (8)

Très peu de données sont disponibles sur l'utilisation à long terme des traitements ARV de première ligne dans les pays aux ressources limitées ou le suivi virologique des patients est insuffisant sinon inexistant dans certains pays. Il est donc nécessaire, sinon fondamental, de mener une étude sur le suivi à long terme des schémas ARV de première ligne pour améliorer les recommandations nationales et internationales.

Notre étude a pour objectif principal de mesurer la prévalence de la résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement après 36 mois. Dans une large mesure cette étude permettra de revoir les recommandations nationales et internationales sur la prise en charge des patients sur de long terme.

Hypothèse : une durée d'au moins 36 mois sous traitement antirétroviraux de première ligne sans suivi virologique (charge virale) accélère l'émergence des mutations de résistance et compromet le traitement des lignes ultérieures.

2 LES OBJECTIFS :

2.1 Objectif général :

Mesurer la prévalence de la résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et en échec de leurs traitements de première ligne après au moins 36 mois.

2.2 Objectifs spécifiques :

- Décrire le profil sociodémographique et immunovirologique des patients au moment de la réalisation du test de résistance génotypique.
- Examiner la diversité génétique des différents sous-types de VIH-1 circulant dans cette population.
- Décrire les profils de résistance aux traitements antirétroviraux après au moins 36 mois.
- Proposer des schémas thérapeutiques de relai efficaces pour les patients en échec après 36 mois.

3 LES GENERALITES

3.1 GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH/SIDA :

3.1.1 Définition, origine et historique de la découverte du VIH/SIDA :

Le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquis) est une maladie infectieuse d'origine virale causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se traduisant par un déficit majeur de l'immunité à condition qu'il n'y ait pas d'autres causes physiologiques, pathologiques ou thérapeutiques d'immunodéficience (9). La première définition de l'infection à VIH/SIDA fut établie en 1982 par le CDC (10). Elle reprenait en grande partie les manifestations observées chez les premiers patients d'une part et les observations au cours d'affections en relation avec ce nouveau phénomène d'autre part.

Les infections à VIH dérivent de l'introduction chez l'homme de rétrovirus simiens appelés SIV pour simian immunodeficiency virus. Ces animaux sont chassés et utilisés comme animaux de compagnies et le passage à l'homme peut s'expliquer par des blessures ou des morsures (11). On connaît actuellement plus de 18 espèces de singes infectées par ces SIV, mais chez aucune d'entre elles, ces virus n'apparaissent pathogènes (11).

C'est en 1981 que M. Gottlieb, à Los Angeles, est amené à observer une pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* chez un sujet masculin jeune sans antécédents médicaux notables et présentant un effondrement d'une sous population lymphocytaire jouant un rôle majeur dans l'orchestration des défenses immunitaires : les lymphocytes T porteurs du récepteur CD4, lymphocytes T CD4. Après que l'hypothèse physiopathologique (toxicité du nitrite d'amyle pour les LTCD4) ait été rapidement balayée par les évènements, l'hypothèse d'un agent infectieux transmissible par le sang et les relations sexuelles, va faire son chemin. Et c'est en 1983 dans le laboratoire de L. Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris que va être isolé pour la première fois le virus responsable du SIDA. En 1986, la même équipe isolait chez deux malades portugais hospitalisés à Lisbonne après un long séjour en Guinée Biseau, et présentant un SIDA, un virus apparenté au VIH-1 mais différent au niveau de ses protéines de surface : HIV-2 ou VIH-2 (2)

3.1.2 Epidémiologie :

3.1.2.1 Données sur l'épidémie :

A l'échelle mondiale, 34 millions de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2011. Selon les estimations, 0,8% des adultes âgés entre 15 et 39 ans dans le monde entier vit avec le VIH bien que les circonstances de l'épidémie qui pèsent sur les pays et les régions continuent de varier considérablement.

L'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec près d'un adulte sur vingt (4,9%) vivant avec le VIH, ce qui représente 69% des personnes vivant avec le VIH dans le monde. La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie. Mais environ 5 millions de personnes vivent avec le virus dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-est et de l'Est. Après l'Afrique subsaharienne, les régions les plus fortement touchées sont les Caraïbes, l'Europe de l'Est et l'Asie centrale, ou 1% des adultes vivaient avec le VIH en 2011.

A l'échelle mondiale, le nombre de nouvelles infections continue de diminuer : le nombre de personnes (adultes et enfants confondus) infectés par le VIH en 2011 (2,5 millions) était de 20% inférieur à celui de 2001. A la même année, 1,7 millions de décès dus au SIDA ont été enregistrés dans le monde entier. Cela représente une baisse de 24% de la mortalité liée au SIDA par rapport à 2005. En Afrique subsaharienne le nombre de décès liés au SIDA a diminué de 32% de 2005 à 2011 (1).

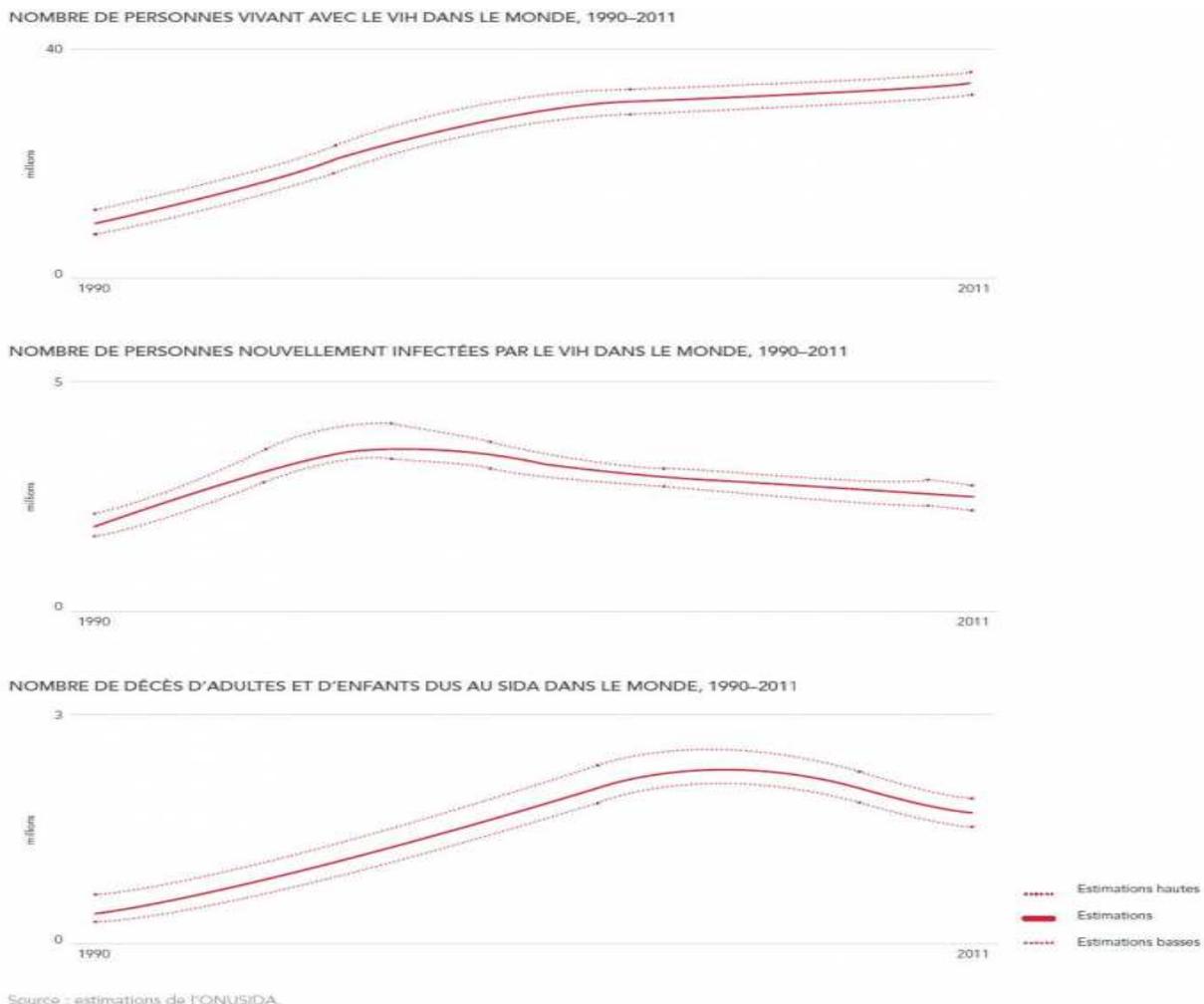


Figure 1 : Les tendances mondiales en matière de VIH, 1990-2011 (1)

Au Mali, les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2006 dans la population générale adulte au cours de l'enquête démographique et de santé (EDS-V) (3) ont montré une baisse du taux de prévalence du VIH de 1,7% à 1,3% faisant du Mali un pays à faible prévalence. La hausse de la prévalence des infections sexuellement transmissibles (IST) pourrait craindre une augmentation de cette prévalence.

Toute fois, l'examen attentif de cette étude révèle des caractéristiques variables selon :

- Le sexe : globalement les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,5% et 1%). La tranche d'âge de 30 à 34 ans est la plus touchée (2,2%)
- Les régions :

Régions	Prévalence en %
Bamako	1,9%
Mopti	1,4%
Ségou	1,3%
Koulikoro	1,2%
Kayes	0,7%
Sikasso	0,6%
Kidal	0,6%
Tombouctou	0,5%

- Les tranches d'âges : le pic de séroprévalence se situe, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, dans la tranche d'âge 30 à 34 ans (2,2%) ce qui témoigne d'une épidémie déjà bien installée.
- Le milieu : la séroprévalence est plus élevée en milieu urbain (1,3%) qu'en milieu rural (0,6%).

L'évolution de la séroprévalence chez les groupes à risque selon l'enquête ISBS (12) 2006 montre une situation toujours préoccupante.

- Chez les professionnelles de sexe : 35,3%
- Chez les vendeuses ambulantes : 5,9%
- Chez les routiers : 2,5%
- Chez les coxeurs : 2,2%
- Chez les aides familiales : 2,2%

3.1.2.2 Mode de transmission :

Trois principaux modes de transmission sont actuellement responsables de l'expansion de l'épidémie du VIH :

✓ **La transmission par voie sexuelle :**

Quatre-vingt pour cent des infections dans le monde ont été acquises lors de rapports sexuels non protégés, hétérosexuels pour 70% d'entre eux, et homosexuels entre hommes pour 5 à 10%. La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait par les muqueuses, muqueuses du vagin, du pénis, du rectum ou de la bouche, en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus.

✓ **La transmission de la mère à l'enfant :**

Ce problème dévient crucial dans les pays en développement. L'ONUSIDA rapport 330 000 enfants nouvellement infectés par le VIH dans le monde en 2011. La transmission du virus de la mère à l'enfant peut survenir à des moments différents, in utero dans les semaines précédentes l'accouchement dans 2/3 des cas, ou pendant l'allaitement.

✓ **Transmission par voie sanguine :**

Ce mode de transmission concerne principalement trois groupes de population:

Les usagers de la drogue par voie intraveineuse, les hémophiles et les autres malades ayant reçu une transfusion de sang ou des dérivés du sang (11)

3.1.3 Les rétrovirus :

3.1.3.1 Définition :

Les rétrovirus se définissent par leur structure mais surtout par leur mode de répllication. Ces virus à ARN, grâce à l'enzyme qu'ils transportent, la reverse transcriptase (RT), en français la transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (TI OU RT), vont avoir leur génome rétrotranscrit en ADN viral qui peut alors intégrer l'ADN chromosomique de la cellule hôte sous le nom de provirus (11)

3.1.3.2 Classification :

La famille des rétrovirus (13), qui recouvre en fait toute particule virale possédant un génome à ARN monocaténaire et une transcriptase inverse, est classée selon des critères morphologiques ou pathologiques. Selon la pathogénie des rétrovirus on distingue trois sous-familles :

-Les **ONCOVIRUS** à ARN sont les rétrovirus les plus répandus. Il s'agit d'oncovirus capables de transformer les lymphocytes TCD4⁺ in vitro. Ces virus sont associés à des tumeurs et à des leucémies. On distingue : Les HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) (14), identifiés à la fin des années 1970 chez des malades atteints de leucémie T ou d'un lymphome cutané (HTLV-1), puis chez un patient présentant une leucémie à tricholeucocytes (HTLV-2).

Récemment, deux nouveaux membres de la famille HTLV, désignés HTLV-3 et HTLV-4, ont été identifiés au Cameroun (15,16).

- Les **LENTIVIRUS** sont des virus qui provoquent des maladies à évolution latente (pneumonies, désordres neurologiques) et qui sont cytopathogènes en culture. Les HIV, ou VIH en français, agents responsables du SIDA, font partie de cette sous-famille (17). Deux types de virus ont été identifiés à ce jour : le VIH-1, le plus répandu sur l'ensemble des continents, et le VIH-2, présent surtout en Afrique de l'Ouest (18,19).

-Les **SPUMAVIRUS** sont des virus identifiés chez de nombreux mammifères, mais ils ne sont associés à aucune maladie connue chez l'homme et chez l'animal (20)

3.2 Caractéristiques :

Tous les rétrovirus possèdent trois gènes majeurs qui codent pour les polyprotéines : les gènes gag, pol, et env. Tous ces virus ont également deux gènes de régulation de la réplication en commun, tat et rev. Le génome viral possède à chaque extrémité (5'et 3') une même séquence répétitive de taille variable dite LTR (Long Terminal Repeat) permettant une réplication intense du matériel génétique viral et son intégration stable dans l'ADN de la cellule cible (11) . Les lentivirus ont cependant quatre gènes auxiliaires : nef, vif, vpr et vpx. Les protéines produites par ces gènes semblent avoir une influence sur le taux de réplication et la virulence virale.

3.1.4 Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) :

3.1.4.1 Structure et organisation génomique des VIH :

En microscopie électronique, les VIH-1 et VIH-2, sont des particules de 90 à 120 nanomètre avec une enveloppe hérissée de spicules. (fig.2)

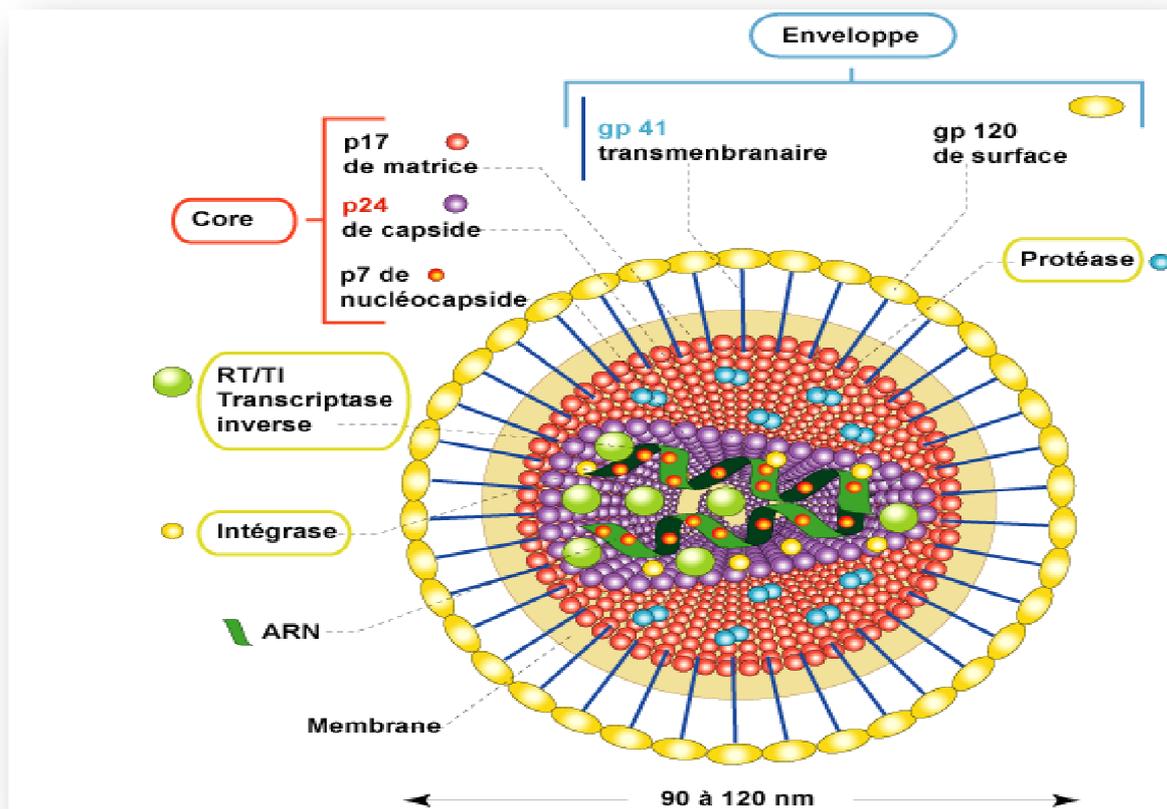


Figure 2 : structure du l'HIV-1. (11)

Le core viral comprend deux molécules d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales : la transcriptase inverse ou rétrotranscriptase, l'intégrase et la protéase. La capside virale est constituée de la protéine interne dite majeure, car la plus abondante, d'un poids moléculaire de 24 Kda : c'est la p24. La protéine de nucléocapside (p7) est associée aux molécules d'ARN. La protéine de matrice ou p17 est la plus externe, et est associée à la troisième enzyme virale ou protéase. L'enveloppe virale entourant cette nucléocapside est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales : la glycoprotéine transmembranaire gp41 traverse la double couche lipidique et est liée par des liaisons faibles à la glycoprotéine de surface qui forme l'enveloppe externe, gp120, l'enveloppe faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules qui correspondent à des trimères de ces glycoprotéines.

Le génome des VIH-1 (fig3), sous forme d'ADN, a une longueur d'environ 9200 nucléotides et est flanqué de chaque côté par des séquences répétitives appelées LTR.

Comme tous les rétrovirus, les VIH ont trois gènes de structure, gag, pol et env, codant respectivement les protéines internes, les trois enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe.

La structure des VIH-2 est similaire au VIH-1; seul changent les poids moléculaires des protéines et enzymes et constitutives de ce virus. L'homologie globale est de l'ordre de 50%, assez forte au niveau des protéines internes et plus faible au niveau des glycoprotéines d'enveloppe (39%) (11).

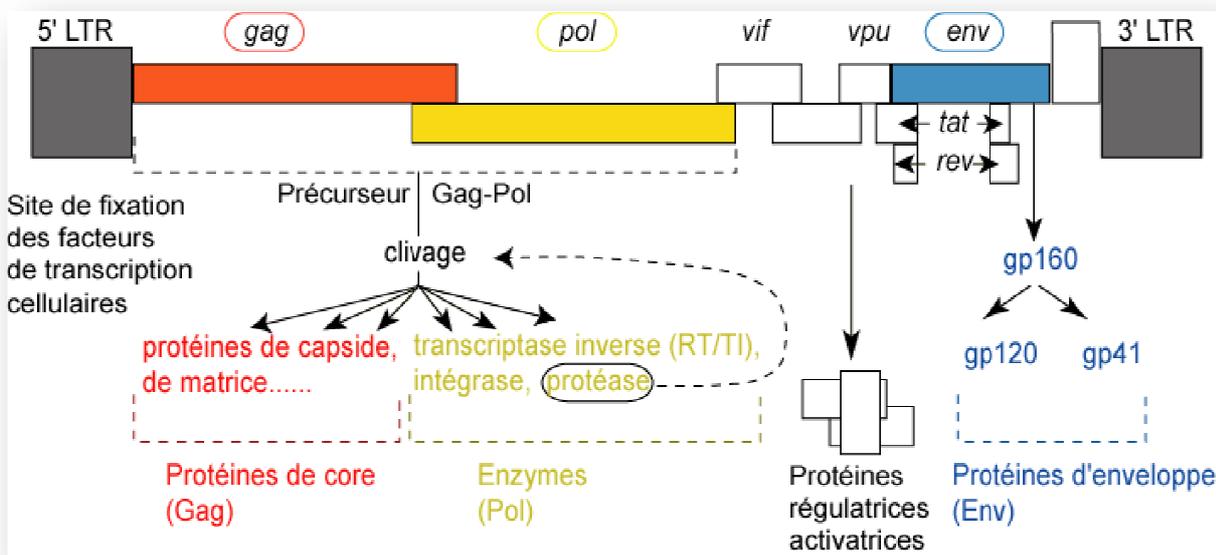


Figure 3 : Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1 (11)

3.1.4.2 Cycle de réplication :

Cibles des molécules antirétrovirales, les principales étapes du cycle répliatif du VIH sont communes aux Rétrovirus. 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 (CCR5 ou CXCR4). Cette fixation dévoile la gp41, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Jusqu'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, des études ont montré que cette étape pouvait avoir lieu également dans la capsid, présente dans le cytoplasme (21).

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

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

forme provirale 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 polyprotéines, en ayant subi une étape d'épissage au préalable ou non.

Les polyprotéines 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 gag 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 capsid est définitivement assemblée (21).

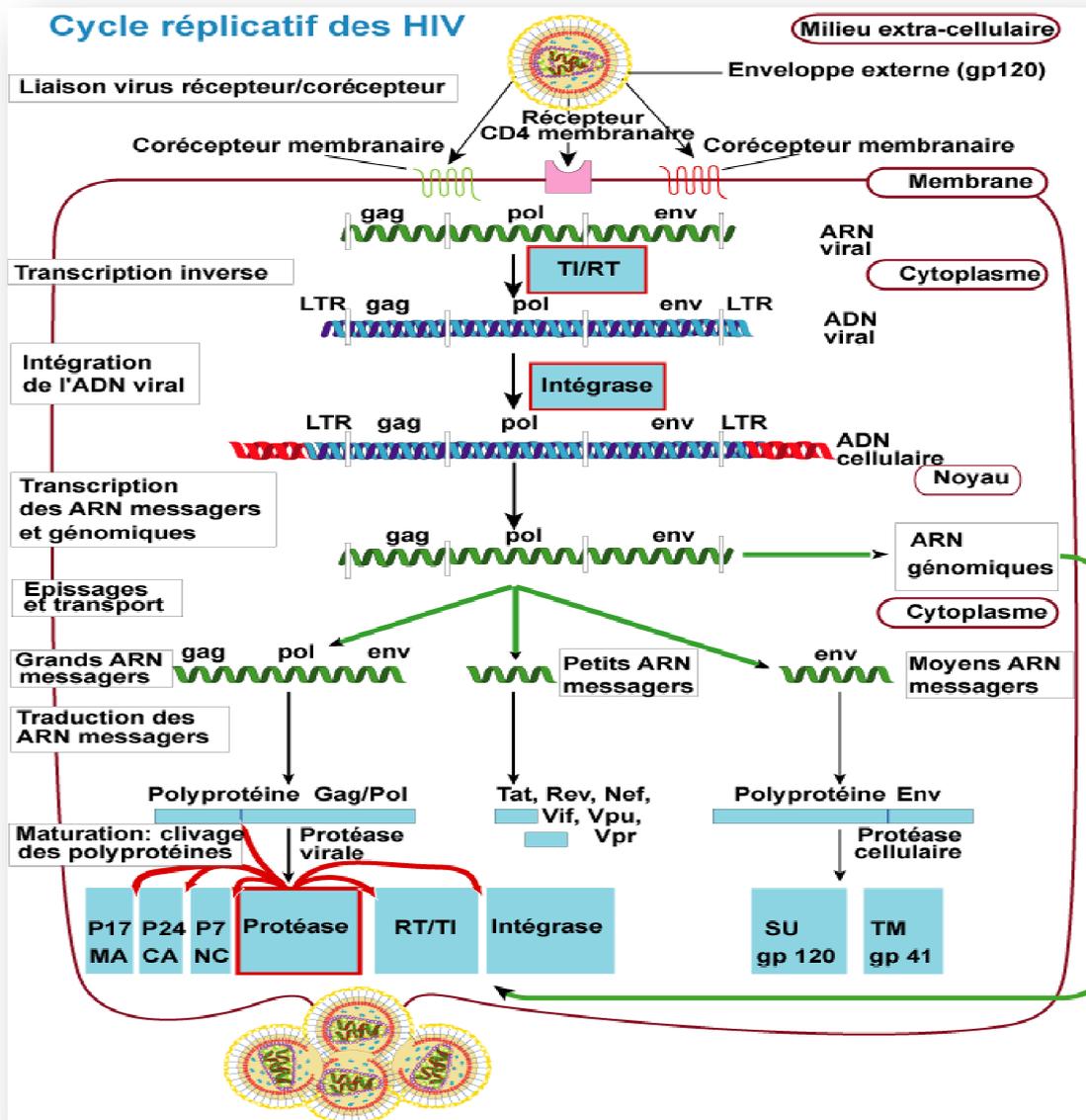


Figure 4 : Cycle de réplcation des VIH (11)

3.1.4.3 Variabilité génétique des VIH :

Sur la base des distances génétiques entre les VIH-1 retrouvés chez les patients, une classification des VIH-1 en quatre groupes distincts, appelés, M (« Main »), O (« Outlier »), N (« non-M, non O ») et P a été établie. Le groupe P est un nouveau variant VIH-1 identifié récemment chez une femme Camerounaise (22). Le groupe M (Majoritaire), regroupe 11 sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J et K) dont le sous type majoritaire est le C qui représente 50% des infections dans le monde. La répartition géographique de ces sous-types est variable <http://www.hiv.lanl.gov>. Récemment 03 sous-types du groupe M (A3, A4 et A5) ont été identifiés (22). Les groupes O et N, beaucoup plus rares, sont retrouvés principalement au Cameroun avec une prévalence de 2 à 5 %. Dans le cas de co-

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

infection par plusieurs types de VIH-1, des phénomènes de recombinaisons entre les virus distincts permettent l'émergence de virus recombinants, les « Circulating Recombinant Form » (CRF), composant de véritables mosaïques des différents sous-types. Parmi les 55 CRF identifiés, les plus fréquemment décrits sont le recombinant CRF01-AE jouant un rôle important dans l'épidémie en Asie et le CRF02-AG responsable de l'épidémie en Afrique de l'Ouest (Mali) et qui est très fréquemment retrouvé en France. Plus de 200 formes recombinantes ne correspondent pas à ces critères de classification, appelées unique recombinants forms (URF) ont été identifiées à ce jour.

De même que les VIH-1, les VIH-2 sont également classées jusqu'à présent en sept sous-types distincts (23) (A, B, C, D, E, F et G). Un virus recombinant du VIH-2 a été identifié (le HIV-2 CRF01-AB) par **W. Sugiura** <http://www.hiv.lanl.gov>.

La variabilité des VIH a de nombreuses conséquences dont la plus importante est la difficulté à développer un vaccin préventif, qui n'est pas non plus sans conséquences sur la physiopathologie de la maladie et sur la prise en charge thérapeutique des patients infectés par le VIH-1 de sous type non B.

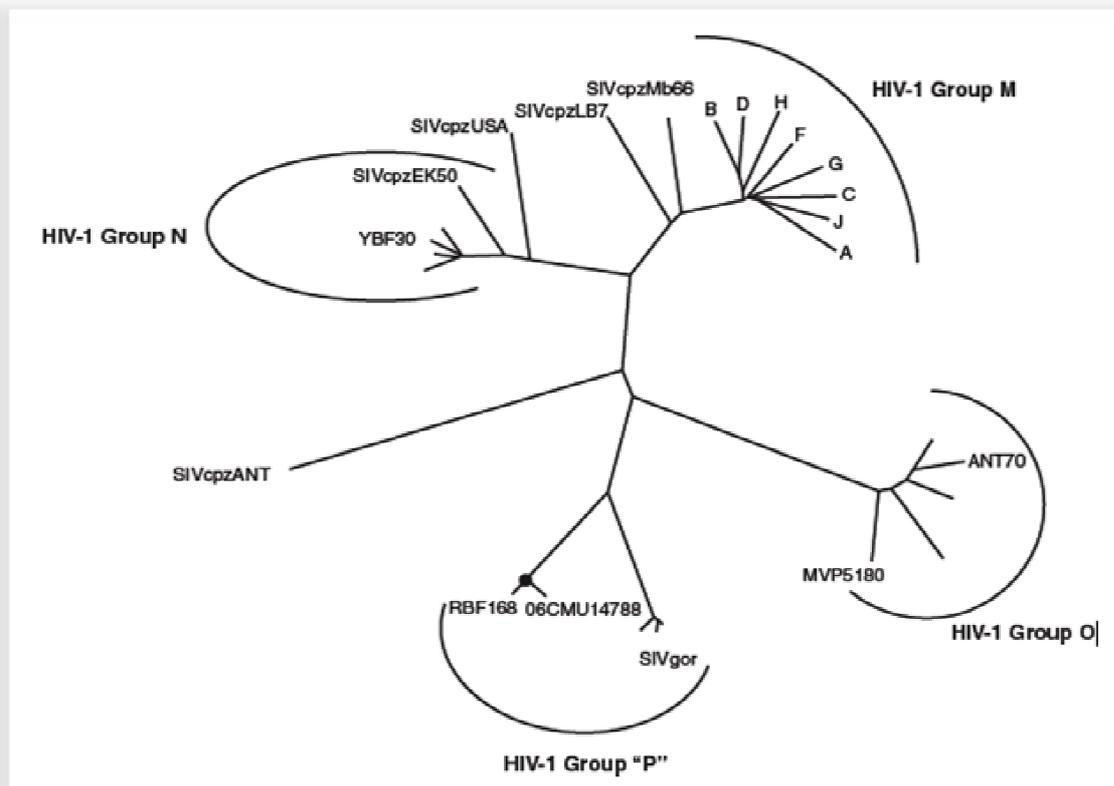


Figure 5: Arbre phylogénétique des VIH (22)

3.1.4.4 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 (24).

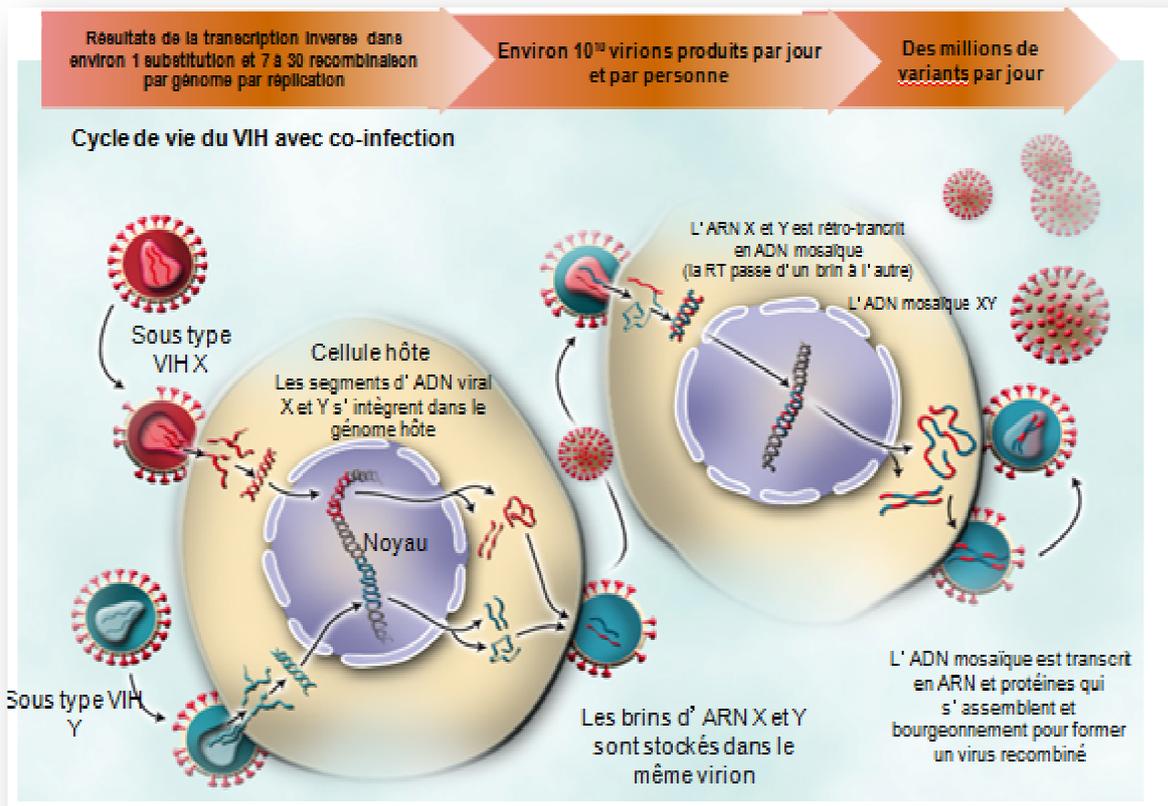


Figure 6 : Mécanisme de la recombinaison génétique (25)

3.1.4.5 Conséquences de la diversité génétique :

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de la réplication couplé à une faible fidélité de la TI et au phénomène de recombinaison génétique, elle est due à différents mécanismes, et a des impacts multiples sur le diagnostique (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 (24). 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 différents 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 (26).

3.1.4.6 Répartition géographique :

Le VIH est très répandu au niveau mondial (fig8), 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 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.

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. La grande majorité des infections à VIH-1 groupe O est retrouvée en Afrique du Centre-Ouest et particulièrement au Cameroun où il constitue 1,6% des patients infectés par le VIH (27). Des études récentes ont montré 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 existants 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 et 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 (23).

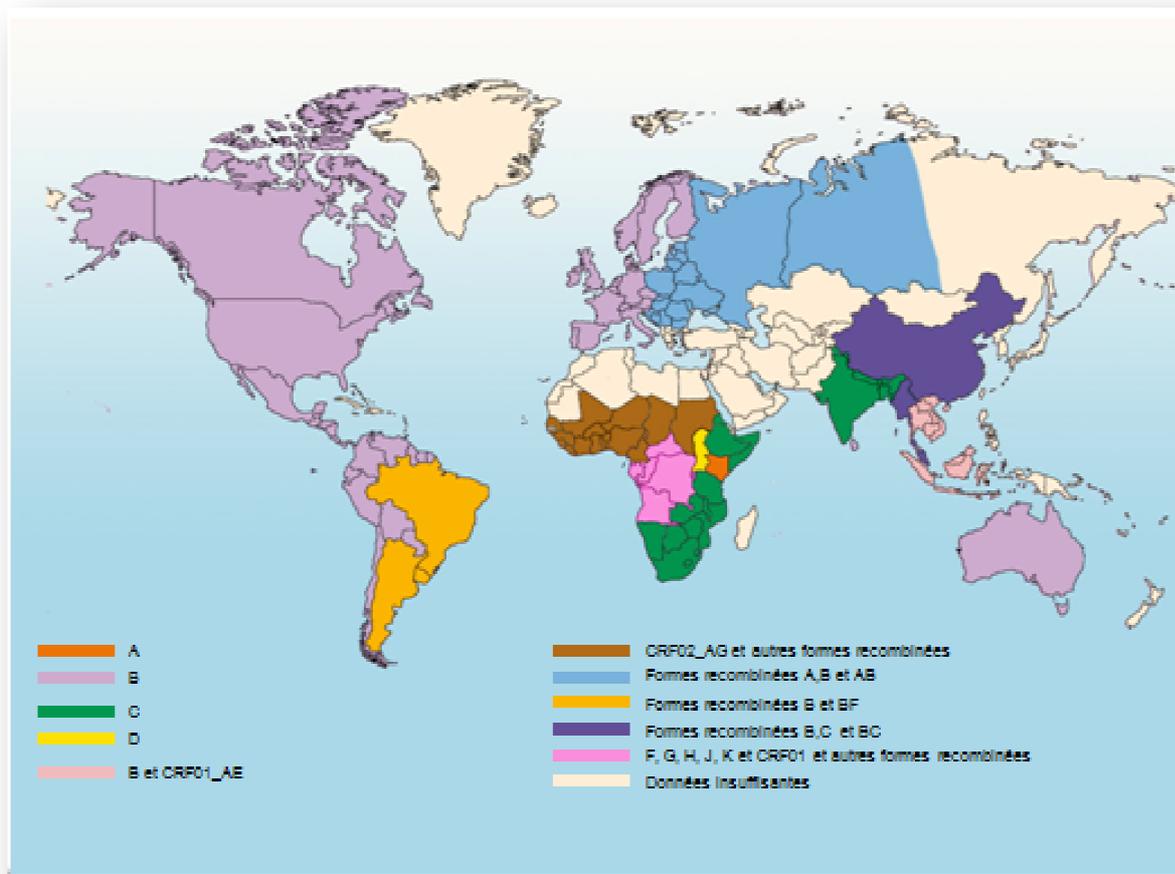


Figure 7 : distribution géographique des VIH-1 dans le monde. Les sous-types les plus fréquents de façon décroissante sont : C, A, B, CRF02-AG et CRF01-AE. (25)

3.1.4.7 Tropisme et récepteurs du VIH :

Les cellules sensibles à l'infection du VIH expriment la molécule CD4 au niveau membranaire. Ce récepteur a été identifié comme étant le récepteur principal du VIH-1 en 1984 (28) , mais il est apparu que cette molécule n'était pas suffisante à l'entrée du virus. Plus de 10 ans plus tard, les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 ont été mis en évidence comme corécepteurs indispensables à l'entrée du VIH-1 dans les cellules (29,30). C'est la découverte de ces corécepteurs et leur expression différentielle à la surface des cellules CD4⁺ qui a permis d'expliquer les différences de tropismes du VIH-1. Ainsi, les virus à tropisme macrophagique utilisent préférentiellement le corécepteur CCR5 et sont de tropisme R5 et les virus à tropisme lymphocytaires utilisent le corécepteur CXCR4 et sont de tropisme X4. Les virus capables d'utiliser les deux corécepteurs sont de tropisme mixte R5/X4.

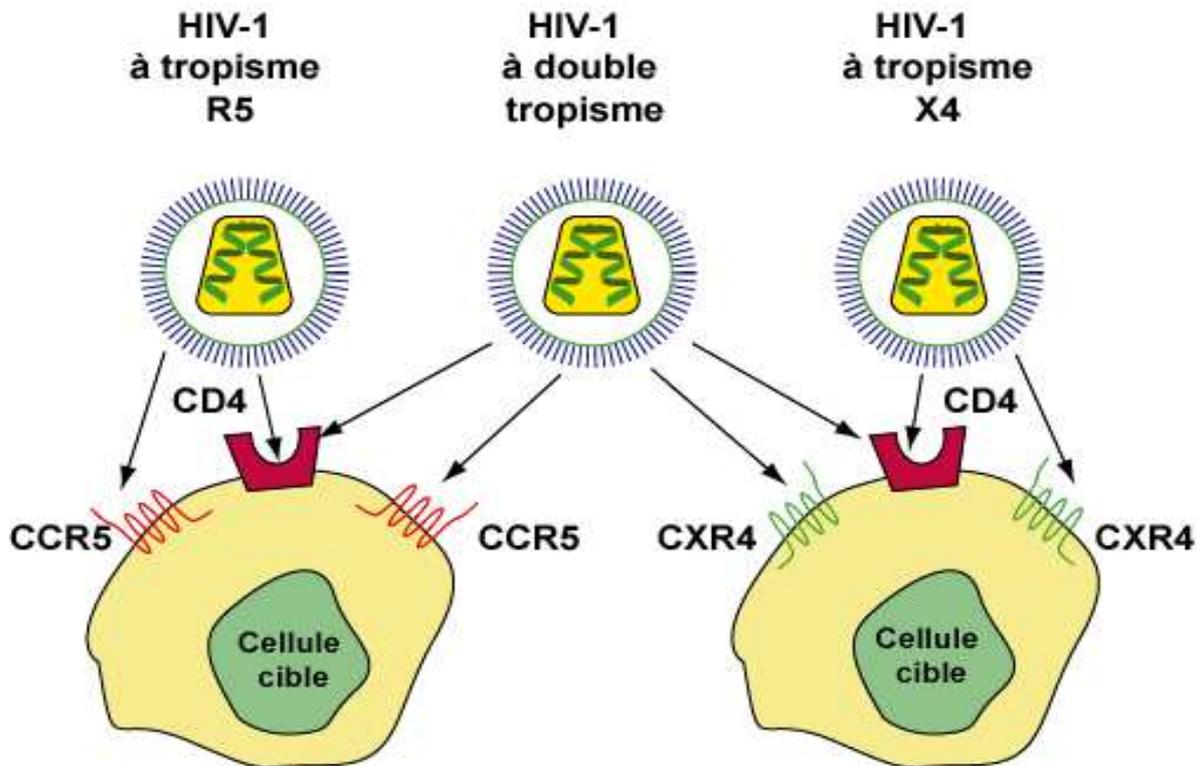


Figure 8 : Corécepteurs et tropisme des souches de VIH-1 (11).

3.1.4.8 Histoire naturelle de la maladie :

L'évolution spontanée de l'infection VIH peut être divisée en trois phases : la phase aigue ou primo-infection, qui dure quelques semaines, la phase chronique, qui dure plusieurs années, caractérisée par une latence clinique mais sans latence virologique et la phase finale, symptomatique, qui dure de quelques mois à quelques années.

Durant ces trois phases, il n'y a jamais de latence virale, et le VIH se réplique activement : à un niveau élevé durant la phase aigue, à un niveau plus faible mais continu, principalement dans les organes lymphoïdes, durant la phase chronique, suivie d'une recrudescence de la réplication durant la phase finale (31).

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

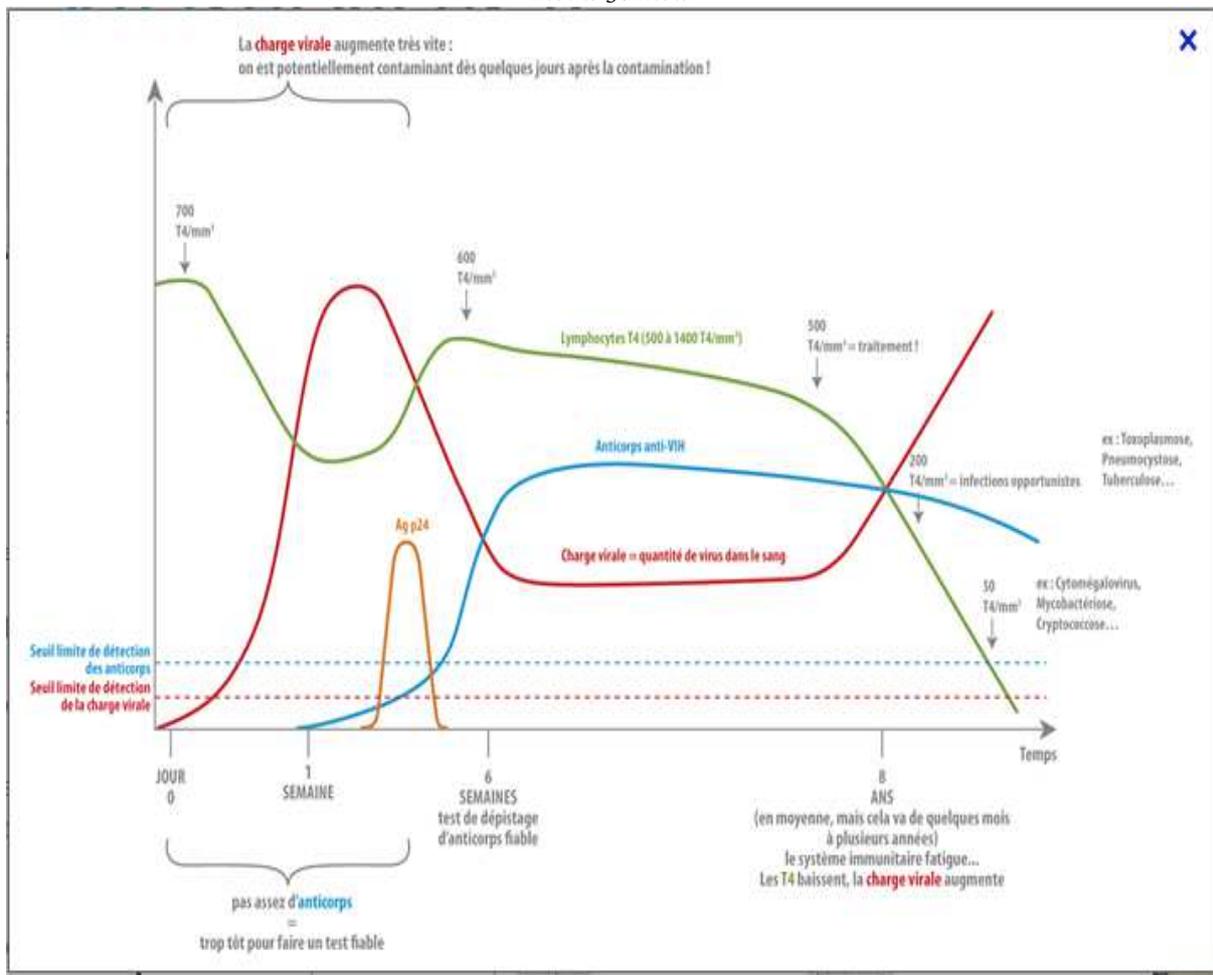


Figure 9 : Evolution typique après infection par le VIH-1 <http://www.vih.servives.fr>.

3.1.4.9 Classification des manifestations cliniques :

A partir de 1983, les Centers for Diseases Control (CDC) ont proposé une classification modifiée de l'infection VIH, en trois stades de sévérité croissante, sans possibilité pour un même patient d'appartenir simultanément à deux stades ni de revenir, au cours de son évolution, à un stade classant antérieur.

Tableau I : Classification CDC de l'infection VIH pour les adultes et les adolescents > 15 ans (révision 1993)

Nombre de lymphocytes TCD4+	Catégorie clinique		
	(A)	(B)	(C)
	Asymptomatique Primo-infection Lymphadénopathie généralisée persistante	Symptomatique sans critères (A) ou (C)	Sida
>500 /mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
<200/mm ³	A3	B3	C3

En 2000, l'OMS a proposé une autre classification (modifiée en 2007) selon quatre groupes, n'intégrant pas le taux de lymphocytes T CD4⁺ et devenue plus utilisée en particulier dans les pays à ressources faibles (tableau).

Tableau II : Classification OMS de l'infection VIH pour les adultes et adolescents ≥ 15 ans (révision 2007) (31)

<p><u>Primo</u>-infection VIH</p> <p>Stade clinique 1 :</p> <ul style="list-style-type: none">- Patient asymptomatique- Adénopathies persistantes généralisées <p>Stade clinique 2 :</p> <ul style="list-style-type: none">- Perte de poids modérée < à 10% du poids corporel.- Manifestations cutané-muqueuses mineures (dermatite séborrhéique, prurigo, atteinte fongique des ongles, ulcérations buccales récurrentes, chéilite angulaire)- Zona au cours des 5 dernières années.- Infections récidivantes des voies respiratoires supérieures (sinusite, otite moyenne ect). <p>Stade clinique 3</p> <ul style="list-style-type: none">- Perte de poids sévère >10% du poids corporel- Diarrhée chronique inexplicée pendant plus d'un mois- Fièvre prolongée inexplicée (intermittente ou constante) pendant plus d'un mois- Candidose buccale persistante (muguet)- Leucoplasie chevelue buccale- Tuberculose pulmonaire, dans l'année précédente- Infection bactériennes sévères- Stomatite ulcéreux nécrosante aigue- Anémie persistante (hémoglobine <8 g/dl)- Neutropénie (neutrophiles <500/mm³)- Thrombopénie chronique (plaquette <50 000/mm³) <p>Stade clinique 4</p> <ul style="list-style-type: none">- Syndrome cachectisant du VIH, selon la définition des CDC- Pneumonie à <i>Pneumocystis jiroveci</i>- Toxoplasmose cérébrale- Sarcome de kaposi et autres etc.

3.2 DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE :

Le diagnostic de l'infection par le 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 diagnostique la plus pertinente et la plus accessible.

3.2.1 Diagnostic Indirect :

3.2.1.1 Tests de 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, 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 ». Les méthodes de référence pour le dépistage sont actuellement les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA combiné (32).

✓Les tests rapides :

Les tests dits rapides, avec une réponse en quelques minutes, sont aussi disponibles et facilement réalisables sans appareillage sophistiqué : les résultats sont obtenus plus rapidement qu'en ELISA classique par lecture visuelle. Si ces tests sont performants pour dépister les anticorps anti- VIH-1 et anti-VIH-2 au cours de la phase chronique de l'infection, ils n'offrent pas le même niveau de sensibilité que les tests ELISA combinés au cours de la primo-infection. Ils constituent un recours pour les situations d'urgences et certains d'entre eux permettent, en plus de différencier les infections à VIH-1 de celles à VIH-2.

Tous les tests de dépistages comportent le risque de résultats faussement positifs, risque qui persiste, même s'il est très faible, en dépit des progrès les plus récents. Cette limite impose, en cas de positivité ou de discordance, le recours à des tests de confirmation.

✓Tests sérologiques de confirmation :

La technique de référence est le Western blot, dans laquelle 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 seule bande colorée correspondant à une protéine particulière du VIH-1 et du VIH-2.

L'aspect et l'intensité des bandes peuvent varier en fonction du mode de préparation industriel du support de la réaction. Il faut donc se référer aux résultats donnés par le témoin positif avec la trousse diagnostic utilisée. Quand peu de bandes sont observées, le résultat doit être interprété en fonction des critères de positivité. Des tests « immunoblot » comparables au Western-blot », fabriqués à partir de protéines et de peptides de synthèse déposés en bandes séparées sur un support, sont agréés comme réactifs de confirmation.

3.2.2 Diagnostic Direct :

3.2.2.1 Détection de l'antigène p24 :

Les méthodes ELISA commercialisées détectent essentiellement la protéine p24 du VIH-1, même si des réactivités croisées avec la p26 du VIH-2 sont parfois observées. La positivité de la réaction doit être confirmée par un test de neutralisation de l'antigène et permet ainsi d'exclure un possible faux positif. La recherche isolée de l'antigène p24 dans le sérum est aujourd'hui pratiquée en cas de suspicion de primo-infection et lors de la qualification des donneurs d'organes, de tissus et de cellule. Comme indiqué plus haut, la recherche de l'antigène p24 est associée à celle des anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 dans les tests d'ELISA combinés.

3.2.2.2 Isolement du VIH en culture de cellule :

L'isolement viral se fait à partir de cellules mononucléés sanguines ou du plasma du sujet infecté grâce à l'adjonction de cellules mononuclées de donneurs sains qui servent de support pour la multiplication virale. Une variante particulière est fondée sur la purification des cellules CD4⁺ du sujet infecté et leur activation avant coculture : cette approche permet de détecter le virus qui constituerait les cellules réservoirs de l'infection VIH (33) . Dans tous les cas, la multiplication virale est détectée par l'apparition de l'antigène p24 et/ou d'une activité enzymatique de transcriptase inverse dans le milieu de culture. La culture cellulaire est entretenue et étudiée pendant plusieurs semaines.

Le VIH-2 est isolé par une procédure identique et détecté par son activité transcriptase inverse ; du fait des réactions croisées, il est souvent détecté par les techniques ELISA de mise en évidence de l'antigène p24 du VIH-1.

3.2.2.3 Détection des acides nucléiques viraux :

L'amplification génique (PCR ou amplification multienzymatique de type NASA) permet de détecter l'ADN proviral intégré dans l'ADN cellulaire et, après une étape supplémentaire de transcriptase inverse, l'ARN génomique contenu dans les particules virales.

Cette technique est intrinsèquement plus sensible que l'isolement viral et, effectuée dans les meilleurs conditions, cette approche moléculaire présente l'avantage d'être bien adaptée à l'étude de prélèvements congelés pour les quels l'isolement viral est plus difficile ainsi que d'être rapide et automatisable.

3.2.2.4 Quantification virale :

La détection de l'antigène p24, la culture virale, l'amplification génique et l'hybridation amplifiée peuvent être utilisées à des fins quantitatives, pour estimer le niveau de répliquons du VIH dans l'organisme infecté (34,35).

Différentes firmes ont développé des trousse de quantification de l'ARN du VIH-1 avec des seuils de détection différents (tableau III).

Tableau III : Sensibilité et spécificité de quelques trousse de quantification moléculaire de l'ARN du VIH-1.

Nom commercial (firme productrice)	Technique	Sensibilité			
		Prise d'essai (ml)	Seuil de détection (copies ARN/ml)	Région amplifiée	Détection des variants
taqMan HIV-1 Cobas test v2.0 (Roche)	Amplification génique (RT-PCR temps réel)	1	20	Gag et LTR	Groupe M sous-type A-H et groupe O
Real time HIV-1 (Abbott)	Amplification génique RT-PCR temps réel)	1	40	Pol	Groupe M, O et P
Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (Siemens)	Hybridation amplifiée (ADN branché)	1	50	Pol	Groupe M
nucliSens Assay HIV v2.0 (Biomérieux)	Amplification génique (RT-NASBA)	1	10	Gag	Groupe M

Aucune de ces techniques ne permet de quantifier l'ARN du VIH-2. A côté de ces techniques, il existe aussi la technique Biocentric qui est une technique générique.

Elle amplifie les LTRs avec une sensibilité au VIH-1 groupe M, sous-type A à H et a un seuil de détection de 50 à 300 copies selon la prise d'essai et la méthode d'extraction

http://biocentric.com/generic-HIV/charge_virale.

3.2.2.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mise au point en 1983 par Karry Mullis, la PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de l'amplifier exponentiellement.

✓Principe de la PCR

La PCR consiste en une succession cyclique de trois étapes. Elle est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce (ou primer), de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier, est un oligonucléotide synthétique d'une longueur de 17 à 30 bases. Son association à l'ADN aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

Le milieu tamponné comprend tous les éléments indispensables : les précurseurs trinuéclotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation Mg^{++} indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, l'ADN polymérase et les amorces. A ce milieu, est ajouté l'ADN extrait du milieu biologique à étudier (36).

3.2.2.6 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction):

La PCR est une technique qui amplifie l'ADN. Par conséquent, pour étudier l'ARN par PCR, il faut passer par une étape intermédiaire, la transcription inverse ou *reverse transcription* (RT), qui transforme l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc). On peut alors réaliser une PCR.

Une enzyme, la transcriptase inverse, qui est une ADN polymérase ARN-dépendante, transforme l'ARN en son ADNc. Cet ADNc pourra être amplifié par la technique de PCR déjà décrite. Pour agir, cette enzyme a besoin, de la même manière que l'ADN polymérase, d'une amorce (37).

Le domaine d'application de la RT-PCR pour le diagnostic clinique comprend l'étude de la charge virale des virus à ARN, l'analyse du produit de l'expression des gènes (38).

3.2.3 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 polymérases après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont 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 (39).

3.2.4 Les outils bioinformatiques d'analyse des séquences de l'ADN :

3.2.4.1 Objet de la bioinformatique:

La bioinformatique est une discipline basée sur les acquis de la biologie, des mathématiques, et de l'informatique. 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 (40).

3.2.4.2 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.

L'objet d'un alignement de séquences est en général pour :

- Quantifier et localiser la similarité
- Trouver la meilleure mise en correspondance des résidus qui conservent l'ordre des séquences. (score de l'alignement)
- Prendre en compte des mutations ponctuelles qui se résument en trois événements majeurs : Insertion, Délétion et Substitution.

3.3 TRAITEMENT ET RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX :

3.3.1 Traitement :

3.3.1.1 Définition des ARV :

Un antirétroviral (ARV) est une classe de médicament utilisée pour le traitement des infections liées aux rétrovirus. Il s'agit de médicaments essentiellement virostatiques (actif sur VIH-1 et VIH-2) qui agissent au niveau des trois enzymes et des protéines cibles nécessaires à l'entrée et à la réplication du VIH dans la cellule.

3.3.1.2 Objectifs du traitement antirétroviral :

A titre individuel, l'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le SIDA en maintenant ou en restaurant un nombre de lymphocytes CD4 $>500/\text{mm}^3$. Dans la cohorte COHERE, la mortalité des hommes ayant un nombre de lymphocytes CD4 $>500/\text{mm}^3$ depuis plus de trois ans est comparable à celle des hommes de la population générale (41)

Pour atteindre ce but, le traitement antirétroviral doit rendre la charge virale plasmatique indétectable (<50 copies/ml), ce qui maximise la restauration immunitaire et minimise le risque de sélection de virus mutants.

Au plan individuel, si l'efficacité immunovirologique est l'objectif principal du traitement antirétroviral, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément :

- La meilleure tolérance possible, clinique et biologique, à court, moyen et long termes,
- L'amélioration ou la préservation de la qualité de vie,
- La réduction de la transmission du VIH.

3.3.1.3 Les obstacles:

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

- les difficultés d'accès aux soins (précarité sociale, désorganisation des structures sanitaires, contexte psychologique...), concernent un nombre significatif de patients ;
- les contraintes de traitement au long cours sont réelles ;
- les phénomènes de résistance acquise aux antirétroviraux actuellement disponibles surviennent chez un nombre croissant de patients ;
- Les complications métaboliques (syndrome lipodystrophique, anomalies glucidolipidiques) laissent présager une incidence accrue de complications vasculaires à moyen ou à long terme.

3.3.1.4 Médicaments antirétroviraux :

Plus d'une trentaine d'antirétroviraux (ARV), appartenant à six classes thérapeutiques, constitue en 2011 l'arsenal thérapeutique antirétroviral dans les pays industrialisés.

Les ARV actuels agissent à différents niveaux nécessaires à l'infection puis à la réplication du VIH dans la cellule :

- Inhibition de la transcriptase inverse, enzyme permettant la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral et précédant son intégration dans le génome de la cellule hôte ;
- Inhibition de la protéase, enzyme nécessaire au clivage des précurseurs polypeptidiques constitutifs des particules virales. Les inhibiteurs de protéase conduisent à la production de virions immatures non infectieux et donc à l'interruption du cycle viral. Inhibant la phase post-traductionnelle de la réplication virale, ils sont actifs sur les cellules chroniquement infectées, contrairement aux inhibiteurs de la transcriptase inverse ;
- Inhibition de l'intégrase, enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN viral au sein de l'ADN chromosomique des cellules hôtes ;
- Inhibition de la fusion entre le virus et la membrane cellulaire ;
- Inhibition des corécepteurs CCR5 du VIH.

La CROI 2011 (Conférence sur les Rétrovirus et les Infections Opportunistes 2011) a permis de faire le point sur *la Rilpivirine*, un non nucléosidique, *le Dolutégravir*, une anti-intégrase, et *le BMS-663068*, un inhibiteur d'attachement en plus des molécules existantes.

La Rilpivirine proche du niveau structural de l'étravirine a été développée par Jansen. Elle a été approuvée en Mai 2011 aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA), elle est en cours d'évaluation en Europe (42).

Le Dolutégravir est un nouvel inhibiteur d'intégrase développé récemment par ViiV Healthcare. Les résultats d'étude de phase IIb permettront de mieux conclure sur l'efficacité du Dolutégravir chez les patients infectés par un virus résistant au raltégravir (43).

Parmi les approches thérapeutiques innovantes figure le développement par BMS du 1^{er} inhibiteur d'attachement BMS-663068.

Son métabolite actif, le composé BMS-626529, se lie à la gp 120 virale et inhibe l'attachement du virus au récepteur principal CD4. Le CRF01_AE et le VIH-2 sont des résistants naturels à cette molécule (44).

3.3.1.5 Principes actuelles de la thérapeutique antirétrovirale :

Une décennie d'utilisation des ARV combinés s'est écoulée. La thérapie antirétrovirale suit les grands principes suivants :

La thérapeutique de référence demeure l'association de deux analogue nucléosidiques inhibiteurs de la transcriptase inverse (INTI) et d'un inhibiteur de protéase (IP) ou d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI). Même si d'autres stratégies ont été évaluées ou sont en cours d'évaluation : stratégies sans INTI, monothérapie IP, 2 INTI + inhibiteurs d'intégrase, IP + anti-intégrase, ce sont encore ces stratégies classiques qui se révèlent les plus sûres, à moyen et long terme pour obtenir l'indéfectabilité durable de la charge virale plasmatique.

3.3.1.6 Associations recommandée :

✓ Le choix des 2 INTI de la trithérapie :

Deux associations fixes se détachent des autres associations d'INTI qu'on peut proposer en première ligne en raison de leur efficacité, tolérance et simplicité d'emploi (1cp/j) : **ténofovir + emtricitabine** (truvada) et **abacavir + lamivudine** (kivexa).

L'association **ténofovir + emtricitabine** (truvada) est plus efficace sur le plan tant virologique qu'immunologique et mieux tolérée que l'association **zidovudine/lamivudine** (45,46).

L'association **abacavir + lamivudine** (kivexa) offre également l'avantage de la simplicité de la prise et de la tolérance (kivexa, 1cp/j). Son efficacité et sa tolérance ont été confirmées dans plusieurs essais, en association avec l'efavirenz (47,48).

Dans l'essai HEAT la non-infériorité **de kivexa** par rapport à **truvada** à été démontrée en termes d'efficacité virologiques (49).

L'association **zidovudine + lamivudine** est celle pour la quelle on dispose de plus de données. Elle a démontré son efficacité et sa tolérance au sein de multiples trithérapies. Elle existe sous la forme d'une association fixe (combivir) à la dose d'un comprimé 2fois par jour.

Toutes les autres associations de 2 INTI présentent un profil moins favorable, que ce soit en termes d'efficacité ou de tolérance, et ne doivent plus être choisies en première intention.

Il en est de même de la trithérapie fixe zidovudine/lamivudine/abacavir (trizivir).

En conclusion,

Les associations fixes TDF/FTC ou ABC/3TC doivent être utilisées préférentiellement dans une première trithérapie.

TDF/FTC doit être préférée si la charge virale plasmatique est $\geq 5\log_{10}$ copies/ml en particulier en cas d'association avec ATV/R ou EFV.

Lorsque la charge virale est $< 5\log_{10}$ copies/ml, le choix entre ABC/3TC et TDF/FTC peut être fait au cas par cas et doit tenir compte d'éléments comme : co-infection VHB, insuffisance rénale.

L'association TDF/FTC doit être utilisée avec précaution en cas d'insuffisance rénale ou de risque de survenue d'insuffisance rénale. L'association ABC/3TC ne peut être utilisée que chez des sujets non porteurs de l'allèle HLA B 5701.

✓Le choix du troisième agent : IP/r vs INNTI vs INI

L'essai ACTG A5142 a comparé une trithérapie avec efavirenz avec une trithérapie avec lopinavir/ritonavir : le taux de réponse virologique était meilleur dans le bras efavirenz mais dans le bras lopinavir/ritonavir, il y avait une meilleure réponse immunologique, moins de résistance en cas d'échec et moins de lipodystrophie (50).

Le raltégravir est le premier représentant de la classe des INI. Il ne nécessite pas d'administration de ritonavir mais doit être donné en deux prises par jour. Le raltégravir à la dose de 400 mg 2 fois par jour a été comparé à l'efavirenz en association avec truvada chez 566 patients naïfs dans le cadre de l'essai randomisé en double aveugle STARTMRK. La non-infériorité du raltégravir a été démontrée en termes d'efficacité virologique. La tolérance du traitement avec raltégravir était significativement meilleure que celle du traitement avec efavirenz. La rapidité de décroissance de la CV est plus importante avec raltégravir qu'avec efavirenz. Le risque de sélection de variants résistants en cas d'échec virologique est plus important et plus rapide qu'avec un traitement comportant un IP/r. Par ailleurs on manque encore de données sur la tolérance au long cours de raltégravir et son coût reste en juillet 2010 plus élevé que celui des autres troisièmes agents recommandés.

Pour l'ensemble de ces raisons, le raltégravir n'est pour l'instant pas recommandé de façon préférentielle pour un premier traitement ARV.

En conclusion, le troisième agent d'une première thérapie doit être préférentiellement un IP/r ou un INNTI.

Au Mali, les régimes préférentiels en première intention ou schéma de 1^{ère} ligne et en deuxième intention ou schéma de 2^{ème} ligne chez l'adulte et l'adolescent sont les suivants (51) :

Schémas de 1^{ère} ligne

(02) INTI+ (01) INNTI

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

Le régime alternatif suivant est possible :

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

Le d4T (Stavudine) contenu actuellement dans les schémas en cours devra être progressivement substitué par un autre inhibiteur nucléosidique/nucléotidique de première ligne.

Les patients VIH-1 du groupe O chez lesquels les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ne sont pas efficaces, utiliser des schémas thérapeutiques associant des inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidique de la transcriptase inverse à un inhibiteur de protéase boosté (IP/r) ou (03) INTI.

Les associations suivantes sont à proscrire :

- TDF + 3TC+ ABC/ TDF + 3TC + ddI (Didanosine) / TDF + ddI + INNTI en raison de la fréquence élevée des échecs virologiques précoces et de la toxicité pancréatique.
- TDF + ddI en raison de sa moindre efficacité, de ses interactions, toxicité augmentée du ddI et baisse des lymphocytes T CD4.
- ABC (Abacavir) + ddI en raison des risques d'accidents cardiovasculaires (Infarctus du myocarde).

Schémas de 2^{ème} ligne

Le schéma de 2^{ème} ligne doit inclure au moins (02) nouvelles molécules dont l'une issue d'une famille différente des familles utilisées en première ligne. La lamivudine (3TC) ou l'emtricitabine (FTC) doit être toujours maintenue en 2^{ème} ligne.

En cas d'échec thérapeutique confirmé VIH 1 et 2 de la 1^{ère} ligne, le schéma préférentiel de deuxième ligne suivant est recommandé :

Deux (02) inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la TI + Un (01) inhibiteur de protéase boosté.

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

Tableau IV : Les alternatives de seconde ligne possibles en fonction des schémas utilisés en première ligne et en cas de contre-indications ou de toxicité de l'une des molécules du schéma préférentiel.

Schéma 1 ^{ère} ligne	Schéma 2 ^{ème} ligne	
	INTI	IP
(AZT ou d4T*) + (3TC ou FTC) + (EFV ou NVP)	3TC + ddI ou ABC + TDF ou TDF + 3TC ± (AZT)	+ LPV/r ou IDV/r ou ATV/r
TDF + (3TC ou FTC) + (EFV ou NVP)	AZT ou ddI + 3TC	ou SQV/r
ABC + (3TC ou FTC) + (EFV ou NVP)	ddI + 3TC ± (AZT) ou TDF + 3TC ± (AZT)	
(AZT ou d4T) + (3TC ou FTC) + (ABC ou TDF)	EFV ou NVP + ddI	

* Pour les malades traités encore par d4T : retirer progressivement cette molécule conformément au plan de retrait.

Schémas de 3^{ème} ligne

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

Choix des combinaisons de molécules :

- Darunavir + Etravirine + Raltégravir
- Darunavir + Lamivudine + Raltégravir
- Etravirine + Lamivudine + Raltégravir

Les indications de traitement antirétroviral chez les enfants et nourrissons pour lesquels l'infection est confirmée sont en premier lieu l'initiation précoce du traitement ARV.

Nourrissons :

- Initier le traitement ARV chez tous les nourrissons infectés diagnostiqués dans la 1^{ère} année de vie quelque soit le taux de CD4 ou le stade clinique OMS.

Enfants :

- Initier le traitement ARV chez tous les enfants infectés âgés de moins de deux ans, quelque soit le taux de CD4 ou le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV chez tous les enfants infectés âgés de 24 à 59 mois, avec un nombre de CD4 ≤ 750 cellules/mm³, celui le plus bas quelque soit le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV pour tous les enfants infectés âgés de 5 ans et plus avec un nombre de CD4 ≤ 350 cellules/mm³ (comme chez l'adulte) quelque soit le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV pour tous les enfants infectés avec un stade clinique 3 et 4 quelque soit le taux ou le nombre de CD4.
- Initier le traitement ARV pour tout enfant âgé de moins de 18 mois avec un diagnostic clinique présomptif d'infection à VIH.

Les principes du traitement antirétroviral de l'enfant sont identiques à ceux du traitement de l'adulte avec cependant quelques particularités :

- L'éducation thérapeutique de ceux qui ont la charge de l'enfant, garante de la bonne observance, est primordiale.
- Les posologies doivent être ajustées en permanence en fonction de l'évolution pondérale des enfants.
- Il n'existe pas toujours de formes galéniques adaptées à l'usage pédiatrique. Les formes pédiatriques (sirops, suspensions) sont utilisées chez l'enfant de moins de 15 kg ; on préférera les comprimés pour l'enfant de plus de 15 kg.

3.4 Echec thérapeutique :

On appelle échec thérapeutique l'ensemble des situations suivantes :

- Echec clinique, il se caractérise par la survenue de manifestations cliniques témoins de la progression de la maladie VIH (symptômes liés au VIH, nouvelle infection opportuniste ou rechute d'une infection préexistante, survenue de tumeurs). Habituellement ce stade d'échec clinique est la conséquence d'un échec virologique et immunologique, avec des lymphocytes CD4 effondrés et une charge virale élevée.
- Echec immunologique, il est défini par l'absence d'ascension des lymphocytes CD4 malgré un traitement antirétroviral efficace depuis au moins 6 mois. Cette situation se rencontre plus volontiers chez les patients ayant initialement un taux de lymphocytes CD4 préthérapeutique bas, un âge plus avancé.

Cet échec peut s'accompagner d'un succès (charge virale indétectable) ou d'un échec virologique (52). Chez certains patients, la remontée des lymphocytes CD4 est lente, en particulier chez les sujets ayant eu un nombre de CD4 très bas.

- Echec virologique, constitue la situation la plus fréquemment rencontrée. Il est stricto sensu défini comme toute valeur détectable de la charge virale plasmatique, c'est-à-dire juste au dessous du seuil de détection. Plusieurs seuils de détection de la réplication virale dans le plasma ont été utilisés au cours des 10 dernières années (< 400 copies, < 200 copies). Actuellement, un seuil à 50 copies est le plus souvent utilisé et constitue l'objectif à atteindre pour une intervention thérapeutique quelle que soit la situation thérapeutique : traitement initial ou traitements de ligne ultérieure.

3.3.1.7 Mécanismes et conséquences de l'échec virologique :

En règle générale, l'échec virologique résulte d'une inhibition suboptimale de la réplication virale, conséquence d'une puissance insuffisante du traitement. Celle-ci peut être due :

- A une concentration de molécules antirétrovirales insuffisante, qu'elle soit plasmatique, intracellulaire ou au sein d'un sanctuaire de(s) molécule(s) antirétrovirale(s), résultant soit d'un défaut d'observance, soit de posologie inadaptées, soit d'interactions médicamenteuses néfastes ;

- Au développement de la résistance vis-à-vis d'une ou de plusieurs molécules antirétrovirales.

Plusieurs facteurs vont influencer la sévérité de l'échec virologiques et ses conséquences :

- Au niveau de la réplication virale : plus celui-ci est élevé, plus le risque de sélection des mutations de résistance est élevé ;

- Au temps depuis le quel persiste la réplication virale sous pression de sélection, surtout pour les INTI ou les IP, classes thérapeutiques où la résistance est un phénomène graduel ;

- Au type de médicaments présents dans l'association thérapeutique sous la quelle persiste la réplication virale. Cela est une conséquence de la capacité de chaque molécule à sélectionner plus ou moins facilement et plus ou rapidement des mutations de résistance.

- Aux conséquences des mutations ne sont univoques. Si elles impactent négativement l'efficacité antivirale des molécules qui les ont sélectionnées et celles pour les quelles existe une résistance croisée, en revanche certaines mutations peuvent avoir un effet négatif atténué : altération de la fitness virale (M184V) gênant la réplication virale (53) ou encore résensibilisation à d'autres molécules ;

- Au niveau immunitaire : les conséquences cliniques d'un échec virologiques diffèrent selon le niveau des lymphocytes CD4.

Plusieurs risques sont à considérer dans l'échec virologique :

- A un niveau de la réplication virale même modéré, celui de l'accumulation de résistance ;
- Puis la poursuite de la réplication s'accompagne d'une diminution des lymphocytes CD4 et d'une augmentation de la charge virale, ensuite, l'effondrement des CD4 sous le seuil de 100copies/mm³ conduit à la réapparition des événements opportunistes ou manifestations directement liées au VIH.

3.3.2 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 (54).

3.3.2.1 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.

3.3.2.2 Mécanisme d'apparition des mutations de résistance :

Plusieurs facteurs liés à la durée de vie et au cycle de réplication du VIH sont des contributeurs clés vers une émergence rapide et généralisée de résistance qui est observée avec cet organisme.

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 (5).

Ces mécanismes peuvent être dus :

- Variabilité génétique importante du VIH,

La TI fait une erreur par cycle de réplication (1 erreur tous les 10 000 nucléotides), d'où introduction au hasard de mutations tout au long du génome.

Pendant que la plupart de ces erreurs sont des substitutions de bases, autres mutations comme les insertions ou duplications peuvent aussi se produire. Ce qui conduit à un taux important de recombinaisons, d'où l'existence d'une population virale diversifiée appelée quasi-espèce ou variants viraux.

- Dynamique de production virale très rapide, il a été calculé qu'environ 10 milliards de virions étaient produit chaque jour chez une personne infectée.

- Préexistence, avant tout traitement, de variants viraux présentant des mutations de résistance aux ARV, qui peuvent s'accumuler.

3.3.2.3 Mécanisme de la résistance aux antirétroviraux :

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

3.3.2.4 Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :

Deux mécanismes moléculaires distincts sont responsables de la résistance aux analogues nucléosidiques : la diminution de l'incorporation de l'analogue lors de la synthèse de l'ADN et l'excision de l'analogue de la chaîne d'ADN.

- **Diminution de l'incorporation de l'analogue :**

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. La substitution d'une méthionine par une valine gêne l'incorporation du 3TC/FTC au niveau du site catalytique de l'enzyme générant la résistance à cette molécule. 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 variables). L'utilisation de ténofovir en association avec l'abacavir doit être réservée aux patients en échec dont les virus présentent des mutations TAM. 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 amines (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 (55).

- **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 (56,57).

L'accumulation des TAMs 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 (58).

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

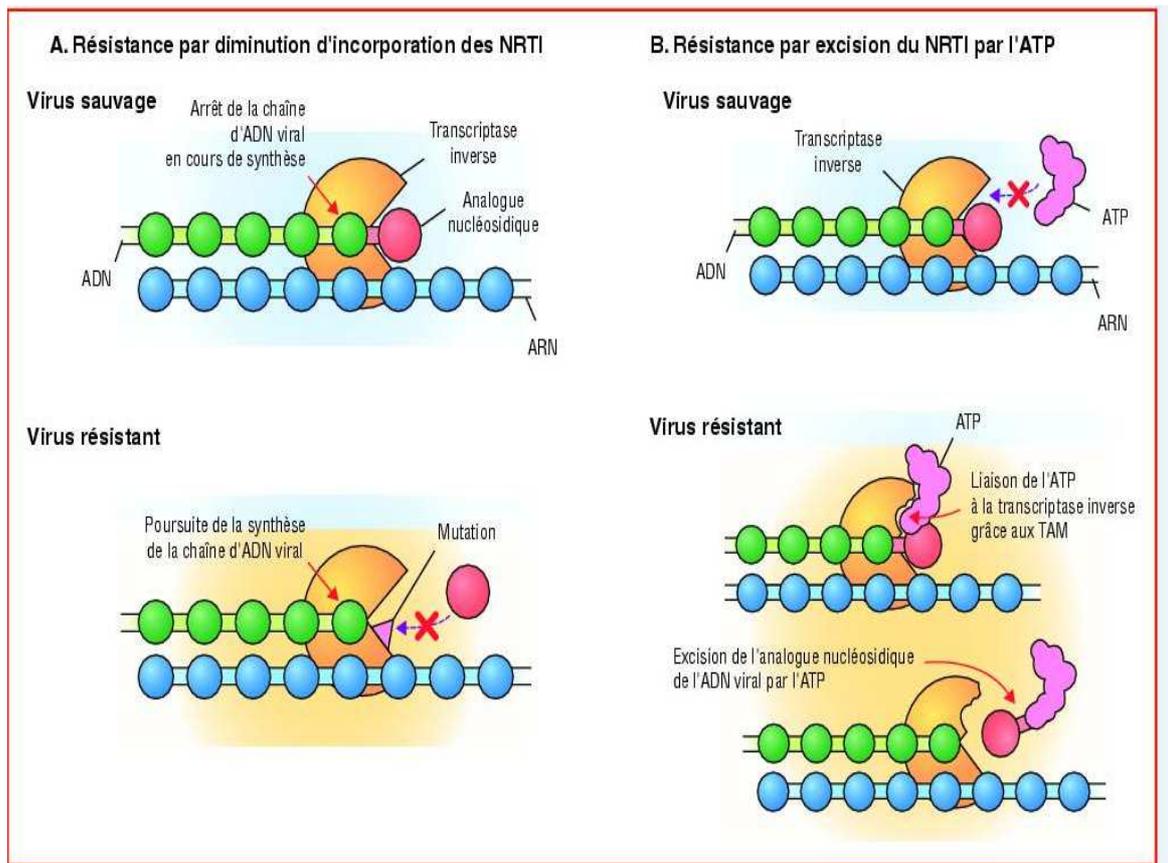


Figure 10 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI (59).

3.3.2.5 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

Les inhibiteurs non nucléosidiques comme l'éfavirenz et la névirapine 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 puisqu'une mutation au niveau de la poche hydrophobe confère une résistance croisée entre efavirenz et névirapine, 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 (60,61). L'essai DUET a ainsi démontré que la mutation K103N n'avait pas d'impact délétère sur la réponse virologique à l'Etravirine. 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 (62).

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 réplication résiduelle sous éfavirenz ou névirapine 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.

3.3.2.6 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.

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 (63)

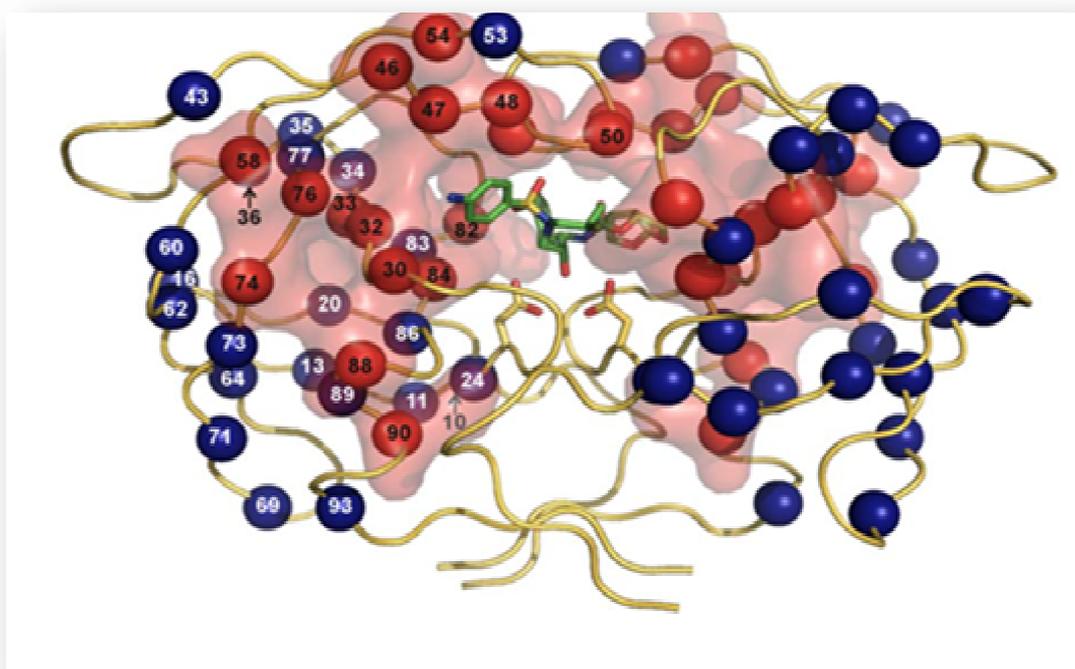


Figure 11 : Position des principales mutations de résistance aux IP (64)

3.3.2.7 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 (Heptad Repeat), 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 variable V3 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 (65). Ces mutations sont situées au niveau des codons 36 à 45 de la gp 41. Elles apparaissent rapidement (quelques semaines) en cas de réplication virale sous T 20. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement 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 (66) mais peu d'isolats cliniques résistants au maraviroc ont été étudiés. La résistance semble associée à des mutations de la boucle V3, variables d'un isolat à l'autre, en particulier aux positions 13 et 26. En pratique clinique, les échappements thérapeutiques aux inhibiteurs de CCR5 ont été attribués le plus souvent à la sélection de virus de tropisme CXCR4, préexistants en proportion minoritaire au traitement et non détectés par les tests de tropisme. La détermination du tropisme virale est donc absolument nécessaire avant la prescription d'inhibiteurs de CCR5. Une autre molécule est en cours de développement, il s'agit du Vicriviroc qui agit aussi sur les virus à tropisme R5.

✓ **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), test recombinant nécessitant l'amplification du gène env du virus plasmatique du patient, puis la construction d'un pseudovirus infectieux alors inoculé sur des cellules exprimant soit CCR5, soit CXCR4. Ce test ne différencie pas un virus à tropisme mixte d'une population virale mixte constituée de virus X4 et de virus X5.

En juin 2008, le test Trofile[®] initial a été remplacé par un test sensibilisé (ESTA : Enhanced Sensitivity Trofile Assay) permettant la détection des sous-populations X4 minoritaires avec une sensibilité de 0,3%. Le test ESTA a été notamment utilisé dans la réalisation de l'essai Merit (maraviroc chez les patients naïfs) (67). 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 de la recherche : le test PhenX-R (InPheno, Basel, Switzerland) et le toulouse Tropism Test (TTT, Université de Toulouse-III Paul-Sabatier (68).

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 (69). L'analyse de la boucle V3 réalisée à partir de l'ARN-VIH-1 plasmatique a, comme pour les tests génotypiques de résistance, une efficacité d'amplification moindre quand les charges virales sont inférieures à 500 copies/ml. Deux systèmes d'interprétations, geno2pheno et PSSM, ont été évalués rétrospectivement dans les bases de données utilisant le maraviroc et ont montré une valeur prédictive équivalente à celle du test Trofile[®] sur la réponse virologique à cette molécule (70).

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 (70)

3.3.2.8 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).

D'autres molécules comme l'elvitégravir et le Dolutégravir sont en cours de développement.

La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection et à l'émergence, sous traitement, de variants 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 associées à une ou plusieurs mutations secondaires, ont été mis en évidence en cas d'échappement virologique au raltégravir (71).

En ce qui concerne l'élvitégravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment les mutations E92G/Q ou N155H ou Q148R/K (72). Il existe une résistance croisée très importante entre la raltégravir et l'élvitégravir.

La barrière génétique des molécules de 1^{ère} génération (Raltégravir et Elvitégravir) de cette classe est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules.

Un nouvel inhibiteur d'intégrase, le S/GSK1349572 (le Dolutégravir), ayant un profil de résistance différent du raltégravir et de l'élvitégravir, est en cours de développement en phase III. Cette molécule est actuellement efficace sur des virus résistants aux molécules de 1^{ère} génération mais reste résistant à tous les virus qui portent la mutation Q148R/K. Dans une étude théorique Maiga et al, ont montré que les VIH-1 de sous-type CRF02_AG échappent préférentiellement avec la voie N155H qui pourrait donner une bonne sensibilité de ces virus aux molécules de 2^{ème} génération telle que le Dolutégravir.

3.3.2.9 Les tests de résistance :

Les tests génotypiques recherchent après séquençage de l'ARN les mutations associées à la résistance aux antirétroviraux. Les tests phénotypiques mesurent la sensibilité du virus aux molécules par culture du virus en présence du/des composés.

✓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 tests génotypiques.

Deux trousse commerciales de séquençage sont disponibles, avec intégration d'un logiciel interprétant le profil de mutation : les trousse des firmes Bayer (trugene HIV-1 genotyping kit) et Abbott (perkin Elmer ABI ViroSeq Genotyping System) ont reçu l'agrément d'utilisation par l'agence française de sécurité sanitaire et de la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis. Ces deux trousse commerciales, évaluées dans un laboratoire, donnaient des résultats très concordants (97,8%).

Il faut souligner que le séquençage ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant au moins 20 à 30 % de la population virale totale circulante dans le plasma. Les techniques de détection des populations virales minoritaires sortent actuellement du cadre de la pratique clinique et sont réservées aux protocoles de recherche.

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 (73).

✓Tests phénotypiques :

Deux firmes proposent des tests phénotypiques commerciaux utilisant une technique de virus recombinants : le test Antivirogram de Virco et PhenoSene de Monogram. Les résultats des tests phénotypiques commerciaux sont exprimés par le rapport entre la CI₅₀ ou CI₉₀ (respectivement concentration inhibitrice 50 % ou 90 %) de la souche du patient et celle d'un isolat sensible de référence. Les tests phénotypiques n'ont pas montré de bénéfice clinique pour la prise en charge thérapeutique des patients et sont peu utilisés en pratique ; en revanche, ils restent aujourd'hui un outil indispensable à l'évaluation de nouvelles molécules in vitro et au cours des essais thérapeutiques (phases I/II) de ces nouveaux antirétroviraux.

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. Le test virtuel n'est pas un test de sensibilité à chaque drogue mais un système d'interprétation d'un test génotypique.

3.3.2.10 Indications et critères d'utilisation des tests de résistances :

Tableau V : Résumé des recommandations d'utilisation des tests de résistance en France.

Situation clinique	Recommandation
Primo-infection et infection récente (<6 mois)	Recommandé
Avant l'initiation du traitement : <ul style="list-style-type: none"> - A la découverte de la séropositivité - Sinon sur le prélèvement disponible le plus ancien - Ou avant de débiter le traitement 	Recommandé dès que possible car avec le temps un virus sauvage dans le plasma peut remplacer le virus muté présent au moment de l'infection qui se sera archivé
Echecs thérapeutiques	Recommandé La décision thérapeutique doit intégrer l'histoire thérapeutique et les tests de résistance antérieurs
Prophylaxie post exposition	A réaliser au cas par cas
Enfants	Mêmes indication que chez l'adulte
Grossesse	Recommandé avant l'initiation du traitement, qu'ils s'agissent du traitement de la mère ou de la prévention de la transmission de la mère à l'enfant

3.3.2.11 Critères de demande de génotypage (cas du Mali)

Comme les tests de résistance sont coûteux, le Mali à décider de les utiliser uniquement pour les patients en échec de 2^{ème} ligne vu la complexité pour proposer un traitement de 3^{ème} ligne.

- Patients en échec de 2^{ème} 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 (≥ 1000 copies/ml) récente datant de moins de 15 jours
- 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) au préalable pour validation (74). Il est aujourd'hui important de réaliser les tests de génotypage de résistance chez les patients en échec de première ligne afin de proposer des schémas de deuxième ligne efficace.

4 METHODOLOGIE :

4.1 Cadre et lieu d'étude :

Notre étude s'est déroulée au centre de recherche et de formation sur le VIH et la tuberculose (SEREFO). SEREFO est situé dans l'enceinte de la faculté de Médecine, et d'Odontostomatologie (FMOS) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali. Ce centre est une initiative de recherche biomédicale qui a débuté en 2003. Il s'agit d'une collaboration entre l'ex-Université de Bamako et l'Institut National de l'Allergie et des Maladies Infectieuses (NIAID) des Instituts Nationaux de la Santé des Etats-Unis (NIH). Le projet est basé sur le concept de soutenir les centres internationaux pour l'excellence dans la recherche dans les pays en voie de développement.

Les activités de SEREFO portent sur :

✓ **Volet laboratoire :**

L'activité de laboratoire est axée sur l'isolement, l'identification et la description des variantes de souches de mycobactéries, l'étude de la réponse immunitaire des patients infectés par le VIH et la tuberculose, la quantification de l'ARN du VIH-1 et le séquençage du génome du VIH-1 pour le génotype de résistance aux ARV.

Le laboratoire dispose d'un espace de haute sécurité nommé BSL-3 (BioSafety level-3) ou laboratoire de niveau P3, certifié par l'OMS en 2006 dans lequel est pratiqué la culture des mycobactéries.

Il y existe un laboratoire de sérologie (pour le diagnostique du VIH), un laboratoire de biologie moléculaire permettant de réaliser la PCR, le Spoligotyping et le RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

L'étude de la réponse immunitaire a lieu dans le laboratoire d'immunologie équipé de FACSCount, FACSCalibur, de LSR II, des centrifugeuses et de deux hottes à flux laminaires.

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

✓ **Volet clinique :**

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

Un autre aspect est l'expertise qu'offre SEREFO aux médecins qui suivent les patients VIH en échec thérapeutique en participant au staff clinico-biologique mensuel de la CSLS.

4.2 Type et période d'étude :

Il s'agit d'une étude transversale et prospective qui s'est déroulée de février 2012 à Mars 2013.

4.3 Population d'étude :

Tous les patients infectés par le VIH-1.

4.4 Critères d'inclusion :

Ont été inclus :

-Patients en échec virologique de première ligne d'ARV depuis 36 mois et toujours sous traitement (INTI, INNTI, IP, exposition à deux classes d'ARV).

-CV \geq 1000 copies/ml.

-Données sociodémographiques disponibles.

-Mesure de CD4 disponible.

-Historique thérapeutique disponible (date de début de traitement ARV, nadir de CD4).

-Patients Consentant à participer ou assentiment des parents.

4.5 Critères de non inclusion :

N'ont pas été inclus-les :

-Patients ne répondant pas aux critères ci-dessus cités.

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

-Patients ayant refusé de participer à l'étude ou non assentiment des parents.

4.6 Calcul de l'échantillonnage :

Nous avons utilisé le logiciel Epi Info pour le calcul de la taille de l'échantillon. La taille de l'échantillon a été fixée à 100 patients en estimant que la prévalence de la résistance pourrait atteindre les 50% après au moins 36 mois de traitement sous ARV sur une population d'étude de 35000 patients infectés par le VHI-1.

4.7 Méthodes utilisées :

Il s'agissait de mesurer la charge virale plasmatique des patients et de faire le génotype de résistance pour ceux ayant une charge virale plasmatique \geq 1000 copies/ml.

Les charges virales plasmatiques ont été réalisées sur Abbott Real Time HIV-1 Quantitative Assay avec un kit prêt à l'emploi, 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. L'alignement et l'analyse des séquences ont été réalisés par des logiciels Sequencing Analysis puis ViroseqTM HIV-1 Genotyping System (Abbott Molecular).

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.

4.7.1 Technique Abbott HIV-1 Real Time™ : (75)

4.7.1.1 Principe:

La RT-PCR en temps réel sur Abbott HIV-1 RealTime™ Quantitative Assay est un test d'amplification de signal de l'ARN cible converti en ADN_c grâce à l'activité de transcription inverse de la polymérase thermostable rTth ADN pour la quantification directe d'ARN VIH-1 dans le plasma ou autres liquides biologiques des individus infectés. En premier lieu, les amorces ou primers de transcription inverse du VIH-1 et du contrôle interne s'hybrident avec leurs cibles respectives et s'étendent au cours d'une période d'incubation prolongée. Ces deux amorces sont non compétitives, et le CI (Contrôle Interne) est détecté même à des niveaux élevés de VIH. La cible de l'amorce VIH-1 est le gène de l'intégrase dans la région pol.

Après l'étape de dénaturation, au cours de laquelle la température de la réaction s'élève au dessus du point de fusion du produit ADN_c double brin : ARN, une deuxième amorce s'hybride avec le brin de l'ADN_c et s'étend sous l'activité de l'ADN polymérase afin de créer un produit d'ADN à double brin. L'amplification exponentielle du produit est réalisée grâce aux cycles répétés entre températures élevées et basses du thermocycleur pour obtenir une amplification des séquences cibles d'un milliard ou plus.

La technologie Abbott HIV-1 RealTime™ utilise deux sondes d'hybridation, une spécifique au VIH et l'autre spécifique au CI (Contrôle Interne).

4.7.1.2 Organisation du local de la charge virale :

Le laboratoire de charge virale sise à côté du bureau du doyen de la FMOS est subdivisé en zones (zone 1 et zone 2). La zone 1 (Z1) est dédiée à l'extraction des acides nucléiques (secteur 1) et à l'ajout des acides nucléiques purifiés au master mix (secteur 2). La zone 2 (Z2) est uniquement réservée à la phase d'amplification et de détection.

4.7.1.3 Procédure de la technique :

✓L'extraction des ARN VIH-1

•Mode opératoire :

La procédure d'extraction des ARN du VIH-1 est réalisée dans le secteur 1.

1. Nettoyer le petit matériel avec l'hypochlorite de sodium à 10%, puis à l'eau distillée et enfin à l'éthanol 70%. Utilisez du papier buvard pour le nettoyage ;

2. Allumez les bains à sec chauffant : réglez le bain des tubes de 12 x 75mm à 50°C et celui des tubes de 1,5 mL à 75°C ;
3. Décongelez les échantillons, les contrôles, les calibrateurs et le contrôle interne s'ils sont congelés, à une température comprise entre 15 et 30°C ou 2 et 8°C (vérifier toujours l'absence de cristaux dans les réactifs, sinon amener les solutions à température ambiante jusqu'à ce qu'ils disparaissent) :
 - Passez les échantillons 3 fois au vortex;
 - Pour les contrôles, les calibrateurs et le contrôle interne, mélangez le contenu des flacons en les passant au vortex et tapotez afin d'en faire tomber le contenu au fond.
 - Si les échantillons, les contrôles et les calibrateurs ne sont pas immédiatement traités, conservez les à une température entre 2 et 8°C pendant maximum 6 heures, le contrôle interne pouvant atteindre 24 heures au maximum ;
4. Etiquetez tous les tubes (nombre requis pour la manipulation, de 24 à 52) : pour chaque échantillon, un tube de 12 x 75 mm et un tube microfuge à bouchon à vis de 1,5 mL ;
5. Préparez le tampon *mLysis* et ajoutez 500 µL de contrôle interne par flacon de tampon de lyse (1 flacon pour un protocole de 24 à 26 échantillons et 2 flacons pour un protocole de 48 à 52 échantillons) et mélangez par retournement 5 à 10 fois tout en évitant la formation de mousse ;
6. Remettez les particules *mMicroparticules* en suspension en secouant doucement d'avant en arrière jusqu'à ce que les particules soient en suspension ;
7. Préparez les tampons de lavage *mWash 1* et *mWash 2* et le tampon d'élution *mElution* en mélangeant par retournement 5 à 10 fois ;
8. Lyse :
 - Adaptez un Combitips de 10 mL à la pipette à répétition ;
 - Ajoutez rapidement 100 µL de particules *mMicroparticules* à chaque tube de 12 x 75 mm à l'aide d'une pipette à répétition ;
 - Mélangez le tampon de lyse *mLysis* contenant du contrôle interne par retournement 5 à 10 fois et ajoutez 2,4 mL (800 µL x 3) à l'aide de la pipette à répétition;
 - Transférez les échantillons (prélèvements, calibrateurs et contrôles) vers les tubes de lyse la quantité étant fonction du protocole utilisé ;
 - Mélangez les échantillons avec le tampon de lyse par aspiration-refoulement ; (Utilisez des embouts à filtre et changez d'embouts après chaque transfert de liquide)
 - Placez les tubes de lyse dans le bain sec chauffant à 50° C pendant 20 minutes.
9. Retirer les tubes du bain sec chauffant et placez-les dans le support de capture magnétique des tubes de 12 x 75 mm (rouge) pendant 2 mm ;

10. Retirer soigneusement le lysat de chaque tube à l'aide de pipettes pasteur stériles à bout fin. N'ouvrez qu'un tube à la fois, retirer autant de fluide que possible et éviter de toucher les microparticules avec le bout des pipettes pasteur ;
11. Premier lavage Wash 1 : Transférez les tubes de 12 x 75 mm vers un support non magnétique immédiatement après le retrait du tampon de lyse :
 - ajoutez 700 µL de solution *mWash* 1 dans chaque tube et remettez les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire ;
 - transférez le liquide de lavage et les particules dans un tube microfuge à bouchon à vis de 1,5 mL étiqueté ;
 - Placez les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute ;
12. Retirez avec soins la solution de *mWash* 1 de chaque tube à l'aide d'embouts de pipettes à filtre. N'ouvrez qu'un tube à la fois et changez d'embouts après tout transfert de liquide ;
13. Second lavage Wash 1 : Transférez les tubes 1,5 mL vers un portoir non-magnétique :
 - ajoutez 700 µL de solution *mWash* 1 dans chaque tube et remettez les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire ;
 - Placez les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute ;
14. Retirez la solution de *mWash* 1 et jetez le liquide
15. Premier lavage Wash 2 : même procédure que le second lavage Wash 1
16. Second lavage Wash 2 : même procédure que précédemment
17. Retirez la solution de *mWash* 2 et jetez le liquide
18. Elution : transférez les tubes de 1,5 mL vers un portoir non-magnétique :
 - Ajoutez 25 µL de tampon *mElution* dans chaque tube et remettez les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire ;
 - Placez les tubes de 1,5 mL dans un bain chauffant à 75°C ;
 - Incubez pendant 20 minutes ; démarrez la muniterie lorsque vous avez placé le dernier tube dans l'incubateur.
19. Retirez les tubes de 1,5 mL du bain chauffant et les transférez vers un portoir non magnétique ;
20. ajoutez 63 µL de solution *mWash* 2 et remettez les particules magnétiques en suspension par aspiration refoulement ; rincez les particules des parois du tube, si nécessaire ;
21. Placez les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) jusqu'à la fin de la préparation du master mix ;
22. Ensuite transférez les éluât vers les tubes 1.5 mL DNase/RNase free de type Beckman correspondants en faisant attention à ne pas toucher aux microparticules.

✓ **Préparation du master mix**

Cette étape se déroule au niveau du secteur 2. Changez de gants.

Si vous effectuez une série de 25 à 48 ou 52 réactions, préparez une seconde solution de master mix à l'aide d'un autre coffret-réactifs pour amplification

1. Décongelez le coffret-réactifs de dosage à une température entre 15 et 30°C ou 2 et 8°C; une fois décongelé, les réactifs peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 24 heures Maximum ;
2. Mélangez par aspiration et ajoutez 271 µL du réactif d'activation VIH-1 (Réactif 1) dans le flacon d'enzyme ADN rTth polymérase thermostable (Réactif 3) et 949 µL du réactif d'oligonucléotides VIH-1 (Réactif 2) dans le même flacon (réactif 3) puis mélangez. S'assurez avant le mélange des différents réactifs qu'il n'y a pas de cristaux dans le fond des flacons.
3. Pipetez le master mix contenu dans le flacon d'enzyme dans un tube DNase/RNase free et passez au vortex pour homogénéiser.
4. Retirez la base et couvercle "StrataCooler 96" (conserver à -20°C) et Portoir de travail en métal pour "StrataCooler 96" (conserver à +4°C) du réfrigérateur et les montez ;
4. Placez une plaque de réaction optique à 96 puits Abbott dans le "StrataCooler 96" ;
5. Distribuez le master mix à l'aide d'une pipette réservée à cet usage, distribuez des aliquots de 50 µL dans la plaque à 96 puits en allant du puits A à H et de A1 à A12, utilisez le même embout pour distribuer le master mix dans tous les puits et éviter la formation de bulles dans les puits ;
6. vérifiez visuellement le niveau de remplissage (50 µL)

✓ **Ajout de l'éluât (addition de l'ARN) au master mix :**

Cette étape est réalisée dans le secteur 1.

1. Transférez 50 µL d'échantillon vers la plaque à 96 puits placée sur le "StrataCooler96" dans l'ordre du puits A à H et de A1 à A12 et éviter toujours la formation de bulles dans les puits. Les puits A1, A2 et A3 sont respectivement occupés par les contrôle négatif, contrôle positif faible et le contrôle positif fort ;
2. Homogénéisez le mélange réactionnel en aspirant et rejetant la solution dans le puits 3 à 5 fois ; utilisez un embout de pipette différent pour chaque transfert d'éluât d'échantillon ;
3. Vérifiez visuellement le niveau de remplissage (qu'un total de 100 µL et pas plus a bien été distribué dans chaque puits ;
4. Scellez la plaque à 96 puits : utilisez un couvercle adhésif optique et fixez-le à l'aide de l'applicateur pour couvercles adhésifs optiques. Ne touchez en aucun cas la surface du film adhésif sinon changer de film adhésif ;
- 5 Séparez les bandes situées sur les bords en utilisant la ligne perforée ;

6 Retirez la plaque à 96 puits du "StrataCooler 96" et placez-la sur la base de support anti éclaboussures et transférez vers la zone d'amplification (zone 2) pour l'amplification et la détection.

✓ **Interprétation et rendu des résultats**

Les résultats sont automatiquement rendus sur la station de travail *m2000rt*. Ils peuvent être exprimés en copies/mL, en log [copies/mL], en unités internationales (UI)/mL, ou en log [UI/mL] ; (1UI = 0,58 copies, 1 copie = 1,74 UI). Les expressions les plus utilisées sont : copies/mL et log [copies/mL].

Tableau VI : interprétation des résultats obtenus sur le m2000rt (en utilisant les volumes 1,0 et 0,6 ml).

Volume de l'échantillon	Résultats en copies/mL et log (copies/mL)	Interprétation
1,0 mL ou 0,6 mL	« Not detected »	Cible non détectée
	« < 40 copies/mL ou < 1,60 log (copies/mL) »	Cible détectée mais concentration inférieure à la limite inférieure de quantification.
	« 40 à 10 000 000 copies/mL ou 1,60 à 7,00 log (copies/mL) »	Cible détectée (la concentration se situe dans les limites linéaires du dosage.
	« >10 000 000 copies/mL ou > 7,00 log (copies/mL) »	Cible détectée mais concentration supérieure à la limite supérieure de quantification.

4.7.2 La technique VIROSEQ™ : (76)

4.7.2.1 Principe de la technique :

Le viroseq™ HIV-1 Genotyping System détecte les mutations dans les régions de la RT et de la protéase 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 (77,78). La totalité du gène de la protéase et les deux tiers du gène de la RT 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.

Le logiciel viroseq™ HIV-1 Genotyping System Software assemble, édite et identifie les mutations au niveau de cette séquence de 1,3 kb. Le logiciel compare la séquence consensus avec une référence connue, HXB-2 (issu d'un sous-type B du VIH-1), afin de déterminer les mutations présentes dans l'échantillon.

Le logiciel utilise ensuite un algorithme de marque déposée pour analyser les mutations et générer un rapport de résistance aux différentes classes d'ARV (INTI, INNTI et IP).

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
- Séquençage
- Electrophorèse
- Analyse des données
- Génotype et rapport de résistance

4.7.2.2 Organisation de la paillasse :

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

- Zone1 : 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).

4.7.2.3 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%,
- 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
- 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 Grid™ 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, 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 ampliTa[®]q 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 ampliTa[®]q 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 ampliTa[®]q 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 ampliTa[®]q 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 ampliTa[®]q 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[™])
- Plaques de centrifugation 96 puits CENTRI SEP
- Plaques optiques de réaction " 96-well optical reaction plate"
- Films optiques "optical adhesive cover"

4.7.2.4 Préparation des échantillons :

Elle s'est effectuée dans la zone1.

Un volume de 500 µl de plasma est ultracentrifugé à 21000g pendant une heure, à 4°C. Le surnageant est retiré, et 600 µl de tampon de lyse sont ajoutés au culot. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 600 µl d'isopropanol sont additionnés, le mélange est centrifugé à 13000g pendant 15min à 20°C.

Le surnageant est prélevé et le culot d'ARN est lavé dans 1ml d'éthanol à 70%. Après centrifugation à 13000g pendant 5 min à 20°C, le surnageant est retiré, et le culot d'ARN est repris dans 50 ou 100µl d'ARN diluant selon la CV, et conservé à -80°C, soit passé directement à la PCR si la réaction de RT/PCR était effectué 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

4.7.2.5 Réaction de la RT-PCR :

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

Le RT Mastermix a été préparé de la façon suivante :

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

Vortexer, brève centrifugation et garder le mélange à température ambiante.

Nous avons distribué 10µl d'ARN extrait dans chaque tube et le mettre dans un thermocycleur ABI réglé de la manière suivante :

Température	Temps	Processus
65°C	30 secs	Libère et relâche les structures secondaires de l'ARN
42°C	5 min	Refroidir pour la température optimale de l'enzyme
	PAUSE	
42°C	60 min	Reverse transcription
99°C	5 min	Inactivation du MuLV RT
4°C	Hold (>10 min)	Maintient 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 thermo-cycler puis remis dans l'appareil pour continuer la réaction.

A la fin de cette réaction, nous les avons laissés à +4°C pendant au minimum 10 min avant de continuer avec la PCR, ou stockés à -20° C si on devrait laisser pour une longue durée.

4.7.2.6 Réaction de la PCR :

Les réactifs ont été décongelés (Vortexer le PCR mix et l'UNG et les centrifuger tous avec l'AmpliTaq)

La PCR master mix a été préparé dans un micro tube et dans de la glace de la façon suivante :

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

Nous avons ajouté 30µl de PCR Master mix dans chaque tube provenant de la réaction de la RT, et chargé les échantillons sur le thermo-cycler. Le programme utilisé sur le thermo cycler était le suivant :

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

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

4.7.2.7 Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence :

Cette préparation s'est déroulée dans la zone post amplification, où nous avons décongelé le Gel Loading Buffer et le Low DNA Mass Ladder (marqueurs de poids moléculaire).

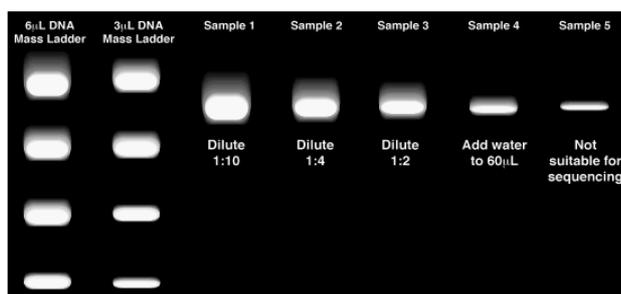
Les produits obtenus à la fin de la PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1%.

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. Nous avons pris soin de surveiller pour éviter les projections et de remuer dès que le mélange commence à bouillir pour que ce dernier soit homogène. Après refroidissement à environ 50°C, nous avons ajouté 4 gouttes de bromure d'éthidium à la concentration de 0,7mg/ml. Ce produit étant mutagène et toxique, pour éviter d'inhaler ses vapeurs, beaucoup de précautions ont été prises avant de couler le gel.

A la polymérisation du gel, le peigne a été retiré et le gel placé dans une cuve contenant du TBE.

La quantité de 5µl de produit PCR pour chaque échantillon, a été mixé avec 5µl de Gel Loading Buffer sur du parafilm, et chargé ce 10µl de mix sur le gel à partir de la position 3, les positions 1 et 2 étant occupées par 6µl et 3µl de DNA mass Ladder, ensuite laissé migrer pendant 30 min à 90 volts, les examinés sous UV et enfin photographié le gel.

Après la photo, nous avons comparé l'intensité de chaque bande à celui du M.L. et diluer le produit de PCR comme indiqué dans le schéma de bande suivant :



Purification des Produits de PCR : Tous les échantillons qui sont sorti positifs sur le gel ont été purifiés en suivant le protocole des colonnes Microcon-100.

Pour chaque échantillon, nous avons inséré une colonne Microcon-100 spin dans un tube de 1,5 ml et ajouté 300µl de kcl (chlorure de potassium) dans chaque colonne sans toucher à la membrane.

Puis nous avons ajouté 45µl des produits de la réaction de PCR au centre de la colonne et fermer les capuchons de chaque tube, et centrifugé pendant 15 min à 500g.

Après cela, nous avons ouvert le capuchon, jeté le résidu et ajouté 300µl d'eau distillée dans le centre de la colonne, centrifuger encore pendant 15 min. A la fin cette centrifugation il a été ajouté 30µl d'eau distillée dans chaque colonne puis les insérer en les renversant dans de nouveaux tubes et centrifuger pendant 5 minutes. Ces produits de PCR purifiés ont été recueillis dans ces nouveaux tubes et ont servi pour la réaction de séquence.

4.7.2.8 Réaction de séquence :

Elle s'est déroulée aussi dans la zone post-amplification, après avoir décongeler les 7 amorces à l'abri de la lumière, nous avons 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	10 secondes	DNA Dénaturation
	50°C	5 secondes	Primer Annealing
	60°C	4 minutes	Primer Extension
-	4°C	HOLD	-

Après la réaction de séquence, nous avons procédé à la purification des produits de PCR séquence par la méthode « NUCLEO FAST 96 de Machely Nagel », qui consiste, après la mise en place du dispositif (voir annexe), à déposer les produits de PCR séquence (tout en respectant l'ordre du schéma de plaque PCR séquence) à purifier puis à ajouter 200µL d'eau DNA free à chaque puit, et cela deux fois successives pour le lavage.

Pour récupérer les ADNs marqués et purifiés, nous avons déposé 50µL d'eau DNA free, bien mélanger puis distribuer 20µL de ces ADNs marqués dans une plaque de séquence ABI 3130. Cette plaque est destinée à passer sur le séquenceur.

4.7.2.9 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 (Changement des tampons, des poubelles et vérification du polymer), la plaque est introduite dans son réceptacle puis introduite dans le séquenceur. On crée un fichier au niveau du logiciel qui se trouve sur l'ordinateur relié au séquenceur ensuite on suit la procédure de lancement de la plaque.

4.7.2.10 Détection des mutations et analyse des données :

A la fin des runs, les échantillons ont été analysés immédiatement par *Sequencing 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 sont 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.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi) a été utilisé pour identifier les sous types de VIH rencontrés chez nos patients, en soumettant nos 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.

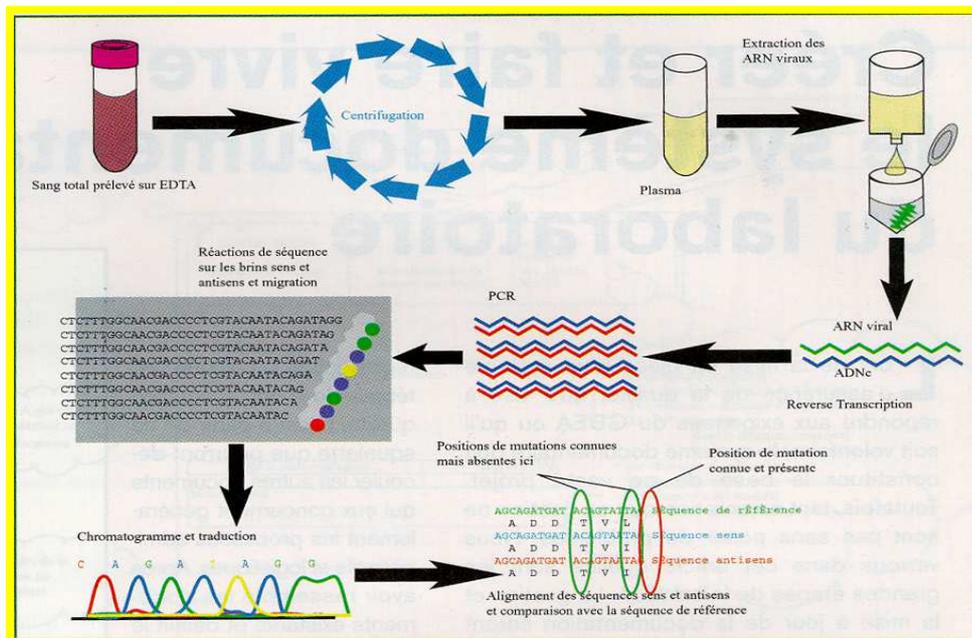


Figure 16 : Schéma de la méthodologie du génotypage

4.7.3 Prélèvement et stockage des échantillons :

✓Prélèvement des échantillons :

Le **viroseq HIV-1 genotyping system** peut être utilisé uniquement avec des échantillons plasmatiques. Prélever 5 ml de sang total dans un tube stérile contenant de l'EDTA comme anticoagulant (tubes VacutainerTM PPTTM, Becton-Dickinson #362788 ou équivalent) et homogénéiser immédiatement en retournant le tube 8 à 10 fois.

Il est recommandé de séparer le plasma du sang total dans les 30 minutes suivant le prélèvement, sans dépasser les 120 minutes en cas d'utilisation de tubes PPT ou leur équivalent.

- Centrifuger les tubes entre 1000 et 2000 × g à température ambiante (15 à 25°C) pendant 15 minutes.
- Dès que possible, transférer le plasma des tubes PPT (ou équivalent) dans les tubes stériles de 1,5 ml en polypropylène, pour les conserver entre -65 et -80°C jusqu'à leur emploi.

✓Transport des échantillons :

Il est possible d'expédier les tubes de plasma conservés entre 2 et 8°C pour une livraison dans les 24 heures ou bien à une température inférieure ou égale à -20°C sur de la carboglace.

✓Conservation des échantillons :

Conserver les échantillons de plasma entre -20 et -80°C. Ne pas congeler puis décongeler le plasma plus de deux fois.

4.8 Analyse des données :

Nos données ont été saisies dans Microsoft office Word et Excel 2007 et analysés par le logiciel Epi Info™ version 7.1.0.6

Nos références ont été insérées avec le logiciel Mendeley-Desktop p-1.7.1-Win 32.

5 RESULTATS

Nous avons réalisé 326 charges virales plasmatiques chez des patients infectés par le VIH-1 et sous traitement antirétroviraux de première ligne après au moins 36 mois de traitement. Parmi ces 326 patients, 102 patients avaient une charge virale plasmatique ≥ 1000 copies/ml et répondaient à nos critères d'inclusion. Parmi les 102 patients, nous n'avons pas pu avoir d'extrait d'ARN VIH pour 10 patients et n'ont pas pu être séquencés pour ces problèmes techniques.

Notre étude nous a permis de réaliser les tests de géotypage chez 92 patients.

Tableau VII : Répartition des patients en fonction de l'âge :

Tranche d'âge (année)	Effectif	Pourcentage (%)
≤ 29	35	38,00
[30-44]	47	51,10
≥ 45	10	10,90
Total	92	100,00

Environ 51,1% de nos patients était dans la tranche d'âge de 30 à 44 ans avec une médiane d'âge de 33 ans et des extrêmes de 4 et 52 ans.

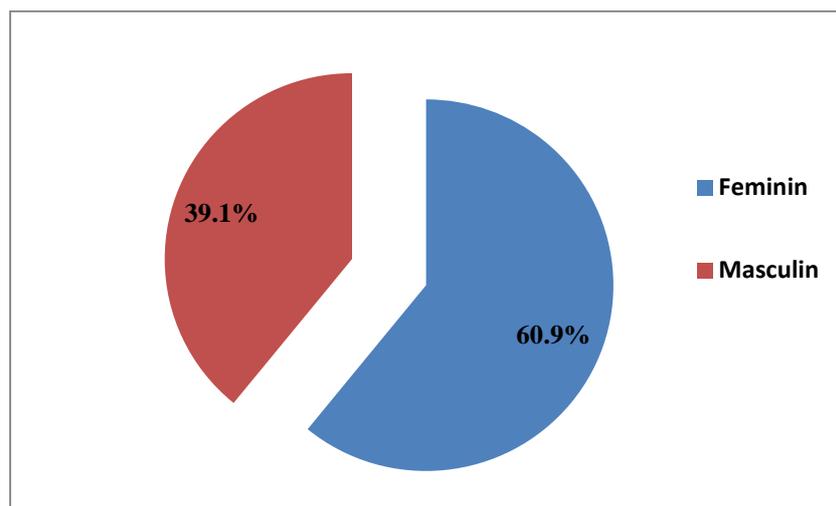


Figure 13 : Répartition des patients en fonction du genre.

Le sexe féminin était prédominant avec 60,90% des patients. Le ratio est de 0,64 en faveur des femmes.

Tableau VIII : Répartition des patients en fonction du service demandeur :

Services demandeurs	Fréquences	Pourcentage (%)
CESAC	17	18,48
GASTRO CHU GT	2	2,17
HFD KAYES	1	1,09
HNF de SEGOU	21	22,83
PEDIATRIE CHU GT	19	20,65
SMIT CHU PT G	2	2,17
USAC CI	26	28,26
USAC CV	4	4,35
Total	92	100,00

La majorité de nos patients provenait de l'USAC de la commune I soit 28,26% des patients suivis de l'hôpital Nianakoro Fomba de Ségou soit 22,83%.

Tableau IX: Répartition des patients en fonction du taux de lymphocytes T CD4⁺ :

Taux de CD4	Effectif	Pourcentage (%)
≤ 350	64	69,60
[351-500]	14	15,20
≥ 500	14	15,20
Total	92	100,00

Par rapport au CD4, 69,60% de nos patients avait un taux de lymphocytes T CD4⁺ < 350 cellules/mm³, avec une médiane de 291,5 cellules/mm³ et des extrêmes de 6 et 1319 cellules/mm³.

Tableau X : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique :

Charge viral copies/ml	Effectif	Pourcentage (%)
1000	6	6,50
[1001-5000]	13	14,10
> 5000	73	79,40
Total	92	100,00

Concernant les charges, 79,4% de nos patients avait une charge virale plasmatique > 5000 copies/ml. La médiane de la charge virale était de 28266,5 copies/ml avec des extrêmes de 1000 et 2938495 copies/ml.

Tableau XI : Répartition conditionnelle de la charge virale plasmatique en fonction du taux de lymphocyte T CD4 chez les 92 patients :

CD4	Charge Virale			Total
	1000	1001-5000	> 5000	
≤ 350	4 (66,67)	13 (92,31)	48 (65,75)	64 (15,22)
[351-500]	1 (16,67)	1 (7,69)	12 (16,44)	14 (15,22)
≥ 500	1 (16,67)	0 (0,00)	13 (17,81)	14 (69,57)
TOTAL	6 (100,00)	13 (100,00)	73 (100,00)	92 (100,00)

Parmi les 73 patients qui avaient une CV > 5000 copies/ml, 65,75% avait un taux de CD4 < 350 cellules/mm³. Nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre les patients ayant un taux de CD4 < 350 cellules/mm³ et ceux ayant un taux CD4 > 350 cellules/mm³ (p < 0,01).

Tableau XII : Répartition des patients en fonction du traitement antirétroviral :

Traitement actuel	Effectif	Pourcentage (%)
ABC+3TC+LPV/r	8	8,70
ABC+3TC+NVP	3	3,26
AZT+3TC+EFV	7	7,61
AZT+3TC+LPV/r	1	1,09
AZT+3TC+NVP	34	36,96
d4T+3TC+EFV	1	1,09
d4T+3TC+LPV/r	1	1,09
d4T+3TC+NVP	28	30,43
TDF+3TC+EFV	5	5,43
TDF+3TC+LPV/r	4	4,34
TDF+3TC+NVP	2	2,17
Total	92	100,00

Par rapport aux traitements ARV, 36,96% des patients était sous Duovir[®] N (AZT + 3TC + NVP), suivi de 30,43% des patients qui était sous Triomune (d4T + 3TC + NVP).

Tableau XIII : Répartition des patients en fonction de la durée de traitement sous ARV:

Durée de traitement en mois	Fréquence	Pourcentage (%)
36	22	23,91
[37-48]	18	19,57
[49-60]	16	17,39
> 60	36	39,13
Total	92	100,00

Tous les patients étaient sous traitement depuis au moins 3 ans. En effet, 39,13% de nos patients avait une durée de traitement sous ARV supérieure à 60 mois avec une médiane de 50,5 et des extrêmes de 36 et 131.

Tableau XIV: Répartition conditionnelle des traitements au moment du test de génotypage en fonction de la durée sous traitement des 92 patients :

Traitement	Durée de traitement				Total
	36	37-48	49-60	> 60	
ABC+3TC+LPV/r	1 (4,55)	2(11,11)	0 (0,00)	5 (13,89)	8 (8,70)
ABC+3TC+NVP	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (8,33)	3 (3,26)
AZT+3TC+EFV	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (12,50)	5 (13,85)	7 (7,61)
AZT+3TC+LPV/r	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (6,25)	0 (0,00)	1 (1,09)
AZT+3TC+NVP	15 (68,18)	6 (33,33)	5 (31,25)	8 (22,22)	34 (36,96)
D4t+3TC+EFV	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)	1 (1,09)
d4T+3TC+LVP/r	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)	1 (1,09)
d4T+3TC+NVP	5 (22,73)	7 (38,89)	6 (37,50)	10(27,78)	28 (30,43)
TDF+3TC+EFV	1 (4,55)	2 (11,11)	1 (6,25)	1 (2,78)	5 (5,43)
TDF+3TC+LPV/r	0 (0,00)	1 (5,56)	1 (6,25)	0 (0,00)	2 (2,17)
TDF+3TC+NVP	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1(2,78)	2 (2,17)
TOTAL	22	18	16	36	92
	(100,00)	(100,00)	(100,00)	(100,00)	(100,00)

Parmi les 36 patients qui avait une durée de traitement supérieure à 60 mois, 27,78% était sous d4T+3TC+NVP, et parmi les 22 patients qui avaient une durée sous traitement de 36 mois, 68,18% était sous AZT+3TC+NVP

Tableau XV: répartition conditionnelle du nombre de mutations majeurs en fonction de la durée de traitement (pourcentage en ligne) :

Nombre de mutations par durée de traitement					
Mutations	36	37-48	49-60	> 60	Total
	Nbre / %	Nbre / %	Nbre / %	Nbre / %	Nbre / %
M41L	3 (25,00)	3 (25,00)	2 (16,66)	4 (33,33)	12 (100,00)
K65R	0 (0,00)	1 (25,00)	1 (25,00)	2 (50,00)	4 (100,00)
D67N	3 (75,00)	2 (50,00)	0 (0,00)	3 (75,00)	4 (100,00)
insert 69	0 (0,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	2 (100,00)
K70R/E	2 (25,00)	3 (37,50)	0 (0,00)	3 (37,50)	8 (100,00)
L74V/I	1 (25,00)	2 (50,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	4 (100,00)
M184V	18 (26,86)	13 (19,40)	10 (14,92)	26 (38,80)	67 (100,00)
L210W	0 (0,00)	1 (12,50)	3 (37,50)	4 (50,00)	8 (100,00)
T215Y/F	4 (16,66)	5 (20,83)	3 (12,50)	12 (50,00)	24 (100,00)
K219Q/E	2 (28,57)	2 (28,57)	1 (14,28)	2 (28,57)	7 (100,00)
K103N	5 (15,62)	12 (37,50)	5 (15,62)	10 (31,25)	32 (100,00)
E138A/K/G/R	4 (44,44)	0 (0,00)	3 (33,33)	2 (22,22)	9 (100,00)
V179D	4 (23,53)	3 (17,65)	3 (17,65)	7 (41,17)	17 (100,00)
Y181C	3 (12,00)	2 (8,00)	4 (16,00)	16 (64,00)	25 (100,00)
Y188L	3 (37,50)	2 (25,00)	1 (12,50)	2 (25,00)	8 (100,00)
G190A	5 (38,46)	0 (0,00)	2 (15,38)	6 (46,15)	13 (100,00)
H221Y	3 (30,00)	1 (10,00)	2 (20,00)	4 (40,00)	10 (100,00)
P225H	0 (0,00)	3 (75,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	4 (100,00)
M230I	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (100,00)	2 (100,00)
Total	60 (23,07)	56 (24,35)	41 (15,77)	107 (41,15)	260 (100,00)

Parmi les 24 patients qui portaient les mutations T215Y/F, 50,00 % avait plus de 60 mois de traitement et 16,66 % était à 36 mois de traitement et l'accélération de l'émergence de cette mutation avec la durée de traitement était statistiquement significative ($p < 0,01$). La mutation Y181C présentait le même profil.

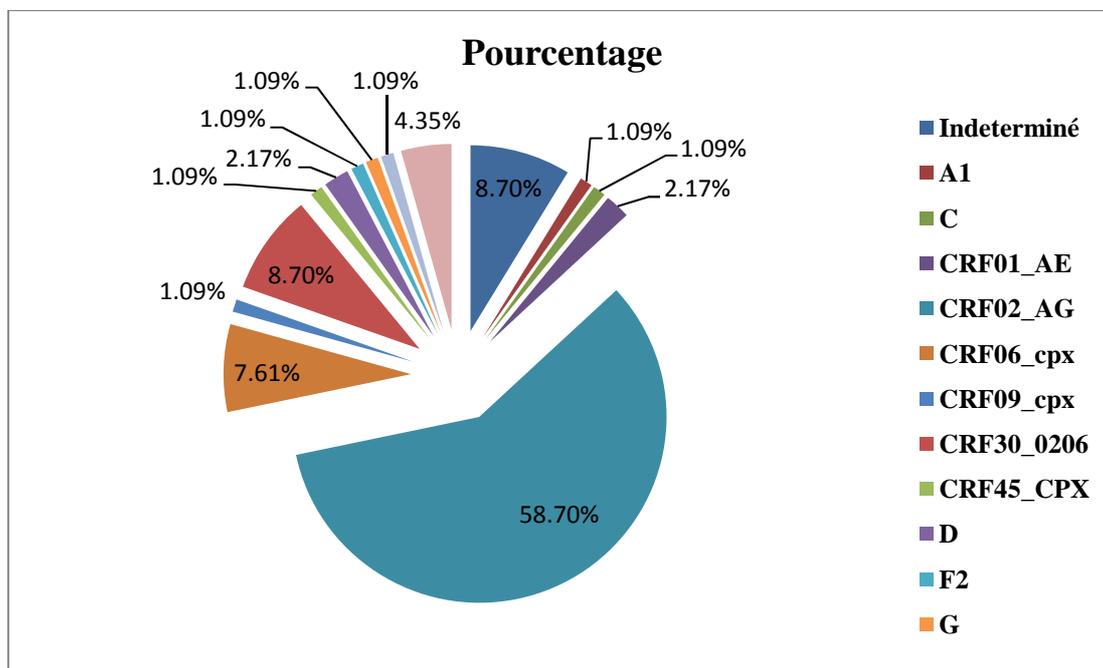


Figure 14: Répartition des patients en fonction des sous-types de VIH-1 : Différentes formes recombinantes circulent au Mali. Ainsi, le recombinant CRFF02_AG était le sous-type le plus prédominant avec 58,7% des cas, suivi du CRF30_0206 soit 8,70% des cas.

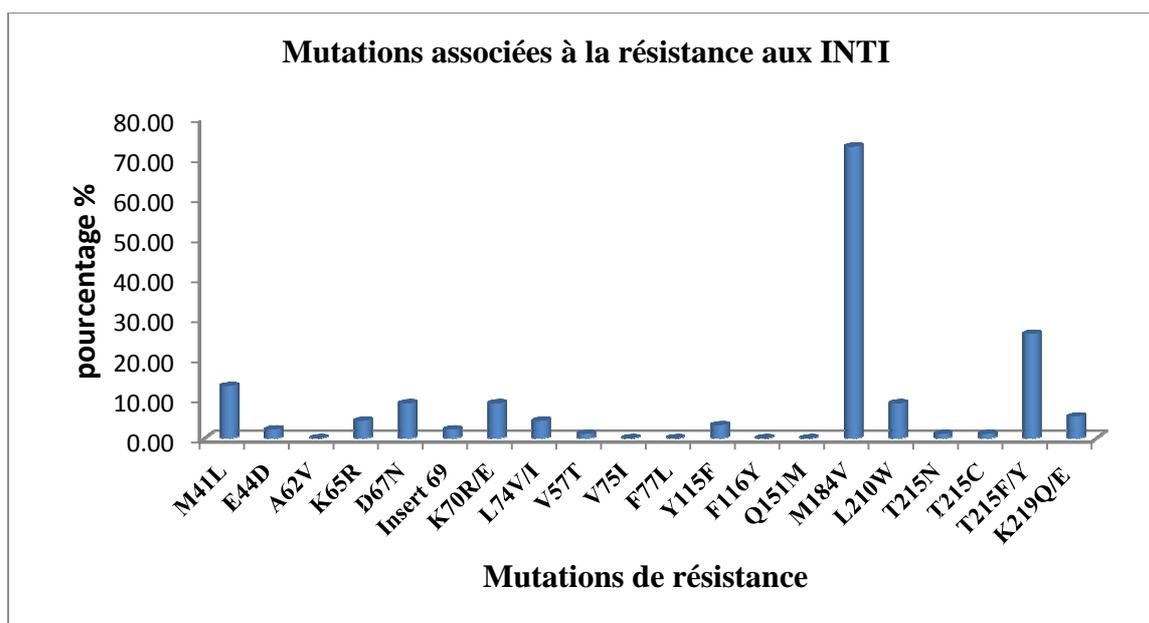


Figure 15: Fréquence des mutations associées aux INTI :

En ce qui concerne la fréquence des mutations de résistance, la mutation M184V conférant principalement de la résistance aux molécules 3TC, FTC et secondairement à l'ABC était la plus fréquente avec 72,83% des cas, suivi de la T215F/Y qui est sélectionnée préférentiellement sous AZT et d4T, soit 26,09% des cas.

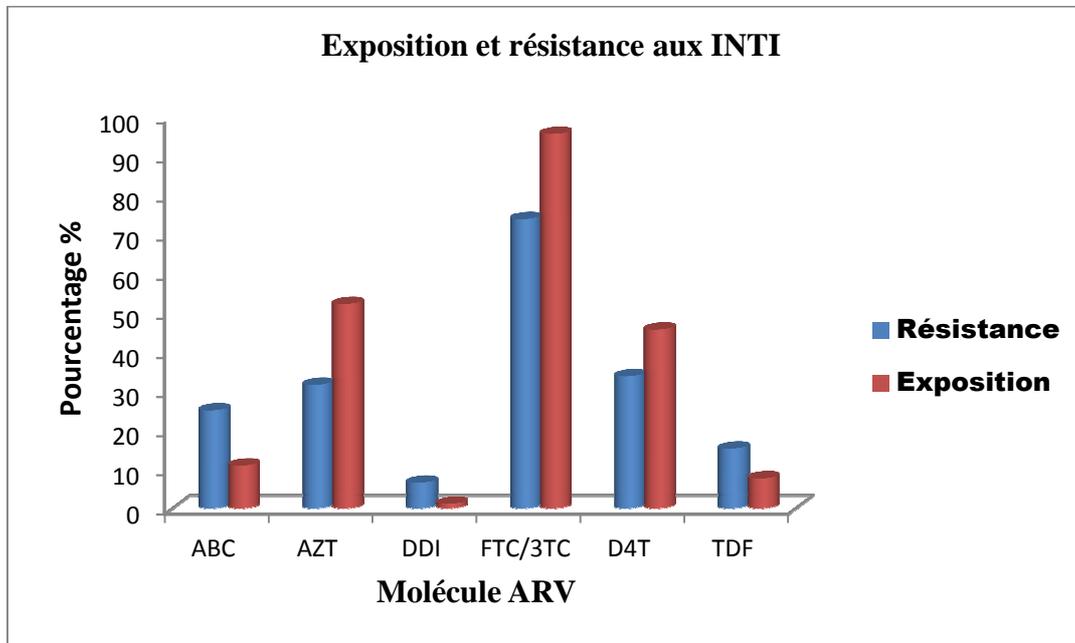


Figure 16: Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI

Les patients étaient exposés à différentes molécules, ainsi 95,65% des patients était exposé aux 3TC/FTC avec 74,71% de résistance suivi de l'AZT 52,17% d'exposition contre 31,52% de résistance.

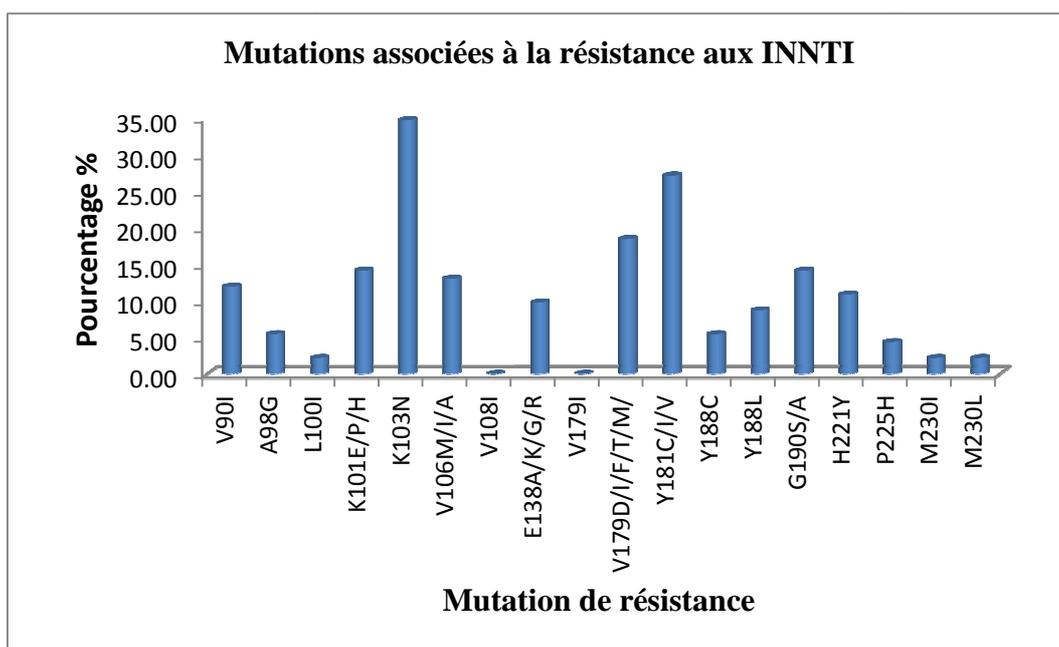


Figure 17 : Fréquence des mutations associées aux INNTI

Les mutations de résistance associées aux INNTI avaient différents scénarii : 34,78% des patients portait la mutation K103N conférant de la résistance à l'EFV et à la NVP, suivi des mutations Y181C/I/V conférant de la résistance à l'EFV, la NVP, la RPV et l'ETR soit 27,17% des cas.

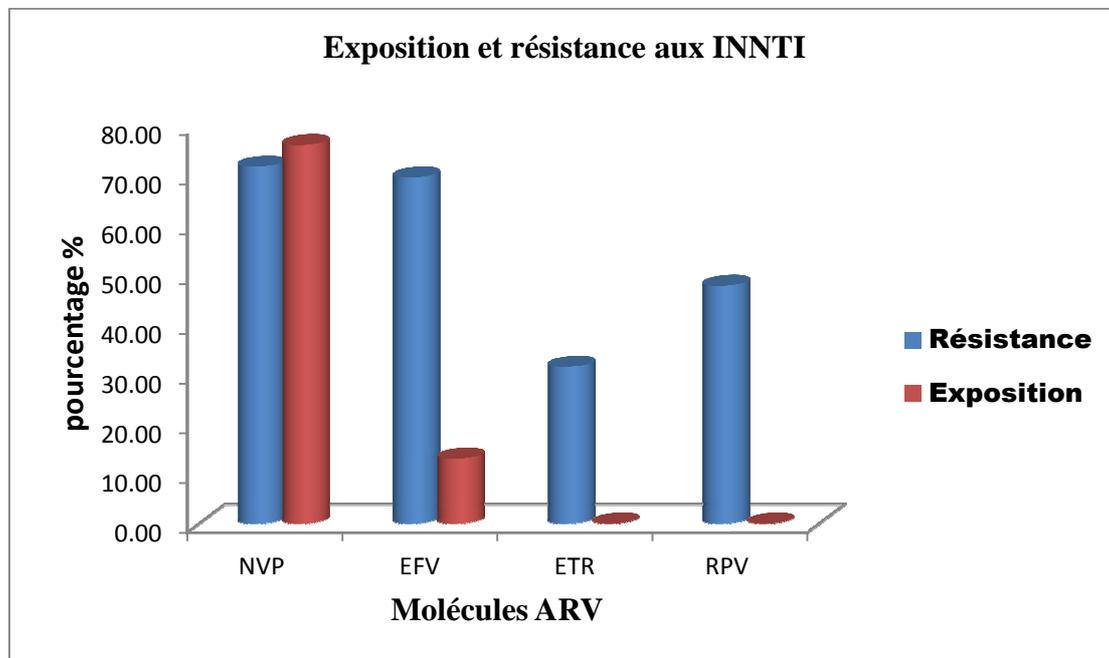


Figure 18: Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INNTI

La fréquence d'exposition par rapport à la résistance aux INNTI se présentait comme suit : 76,09% des patients ont été exposés à la NVP avec 71,74% de résistance, et 13,04% des patients ont reçu l'EFV avec 69,57% de résistance. 47,83% et 31,52% des patients étaient résistants à RPV et à l'ETR respectivement avec 0% d'exposition à ces molécules.

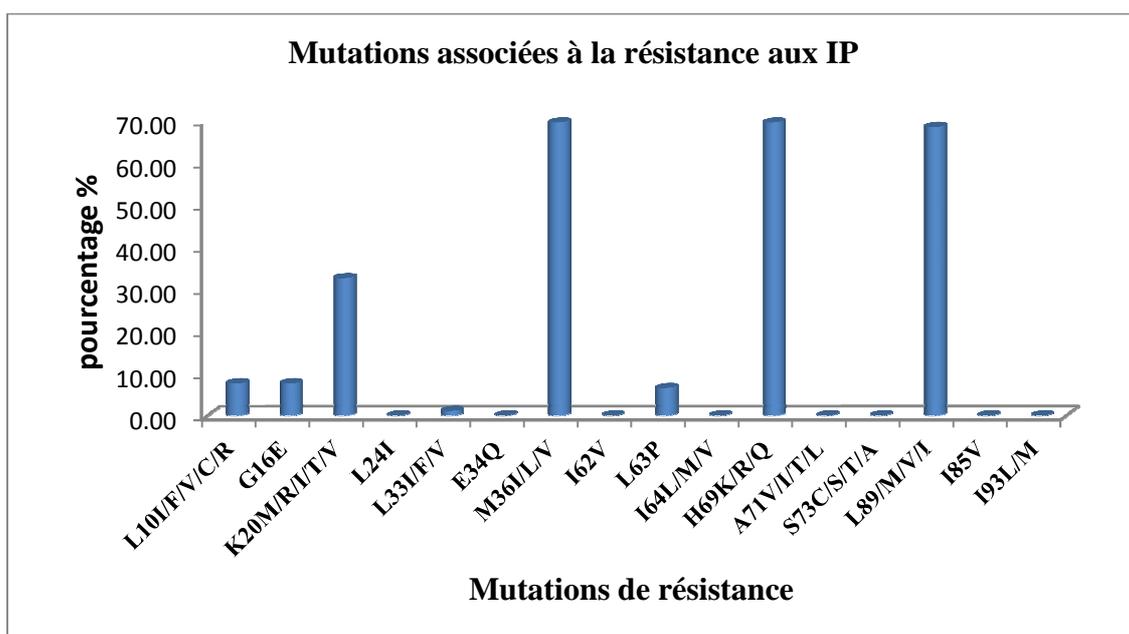


Figure 19: Fréquence de mutations associées aux IP

Concernant les mutations de résistance associée au IP, la plus part des patients portaient les mutations: M36I/L/V chez 69,57%, H69K/R/Q chez 69,56%, L89M/V/I chez 68,48% qui sont tous des mutations mineures ou polymorphiques.

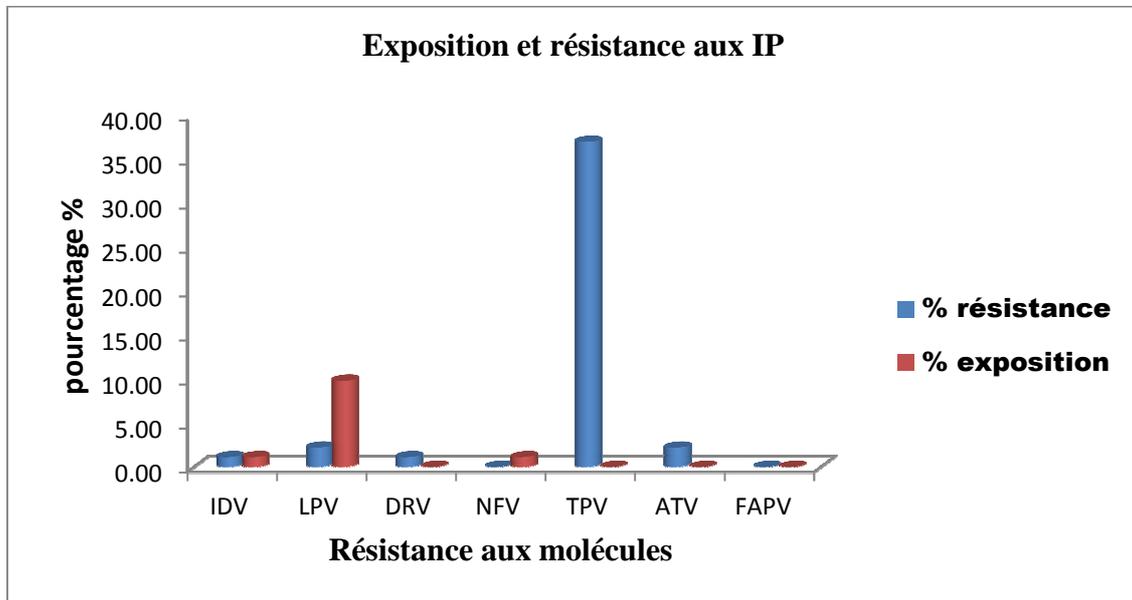


Figure 20 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux IP

Et la fréquence d'exposition par rapport à la résistance au IP se présentait comme suit : 36,96% des patients était résistants aux TPV, 9,78 % des patients ont été exposé au LPV avec 2,17% de résistance, aucun patient n'a été exposé au TPV (figure 25).

Tableau XVI : Impact de l'élévation de la charge virale plasmatique sur la résistance aux ARV.

Résistance aux molécules	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
Abacavir (ABC)	2,2105	0,5751 – 8,4972
Zidovudine (AZT)	1,8246	0,6280 – 5,3012
Stavudine (d4T)	1,9649	0,6796 – 5,6808
Tenofovir (TDF)	1,2632	0,3126 – 5,1046
Didanosine (ddI)	1,0526	0,1317 – 8,4113
FTC/3TC	1,2211	0,8188 – 1,8210
Nevirapine (NVP)	1,0526	0,7356 – 1,5063
Efavirenz (EFV)	1,0144	0,7062 – 1,4569
Rilpivirine (RPV)	1,1128	0,6097 – 2,0310
Etravirine (ETV)	1,8246	0,6280 – 5,3012
Atazanavir (ATV)	1,5263	0,6232 – 3,7379

Tipranavir (TPV)	0,8120	0,4313 – 1,5289
------------------	--------	-----------------

Une CV ≥ 5000 copies/ml apparaît comme un facteur de risque associé à la résistance aux traitements ARV. Notre étude nous montre qu'il y a deux fois plus de chance de développer de la résistance à l'ABC chez des patients ayant une charge virale ≥ 5000 copies/ml que ceux ayant une CV < 5000 copies/ml après au moins 36 mois de traitement ARV.

Tableau XVII: Impact du niveau de taux des lymphocytes T CD4 sur la résistance aux ARV.

Résistance aux molécules	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
Abacavir (ABC)	2,0781	0,7780 – 5,5511
Zidovudine (AZT)	1,3750	0,6657 – 2,8401
Stavudine (d4T)	1,8229	0,8420 – 3,9468
Tenofovir (TDF)	5,6875	0,7814 – 41,3960
Emtricitabine/Lamivudine	0,9792	0,7552 – 1,2695
Nevirapine (NVP)	1,0822	0,8062 – 1,4528
Efavirenz (EFV)	1,2096	0,8675 – 1,6865
Rilpivirine (RPV)	1,1667	0,7127 – 1,9099
Etravirine (ETV)	1,1484	0,5803 – 2,2727
Atazanavir (ATV)	0,7656	0,4404 – 1,3810
Tipranavir (TPV)	1,6875	0,8357 – 3,4076

Un taux de lymphocyte T CD4 ≤ 350 cellules/mm³ apparaît comme un facteur de risque associé à la résistance aux traitements ARV. Les patients ayant un taux de CD4 ≤ 350 cellules/mm³ présentaient cinq fois plus de chance de développer une résistance au TDF que ceux dont les taux de CD4 étaient supérieurs à 350 cellules/mm³ après au moins 36 mois de traitement ARV.

Tableau XVIII : Impact de la longue durée sous traitement sur la résistance aux ARV.

Résistance aux molécules	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
Abacavir (ABC)	1,4929	0,5682–3,9222
Zidovudine (AZT)	1,5086	0,6539–3,4804
Stavudine (d4T)	1,3095	0,6178–2,7758
Tenofovir (TDF)	1,8857	0,4566–7,7878
Didanosine (ddI)	1,5714	0,1938–2,7423
FTC/3TC	0,8730	0,6823–1,1170
Nevirapine (NVP)	1,0686	0,7765–1,4705
Efavirenz (EFV)	1,1224	0,7918–1,5911
Rilpivirine (RPV)	0,8381	0,5296–1,3263
Etravirine (ETV)	0,6984	0,3742–1,3036

Atazanavir (ATV)	1,1673	0,5894–2,3121
Tipranavir (TPV)	0,7543	0,4304–1,3218

Une durée de traitement > 36 mois apparaît comme un facteur de risque associé à la résistance aux traitements ARV. Les patients qui avaient une durée de traitement > 36 mois avaient 88% de chance de développer de la résistance aux TDF que ceux qui étaient seulement à 36 mois.

Tableau XIX : Les facteurs associés au risque d'élévation de la charge virale plasmatique :

Facteurs associés aux risques	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
CD4 \leq 350	1,7544	0,6021–5,1115
Durée de traitement > 36 mois	0,9231	0,7055–1,2078

Un taux de CD4 \leq 350 cellules/mm³ apparaît comme un facteur de risque associé à l'élévation de la CV plasmatique. Les patients qui avaient un taux de CD4 \leq 350 cellules/mm³ avaient 75% de chance d'avoir une CV plasmatique \geq 5000 copies/ml).

Tableau XX : CV plasmatique \geq 5000 copies/ml comme facteurs associés au risque d'apparition des mutations de résistance (CV) :

Les mutations de résistance	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
M184V	1,3567	0,8652–2,1276
L210W	1,4737	0,1946–11,1624
T215F/Y	2,3158	0,6043–8,8744
Y181C/I	1,1053	0,4390–2,7829
Y188L	1,4737	0,1946–11,1624
K103N	1,4737	0,6002–3,6185

Une CV \geq 5000 copies/ml apparaît comme un facteur de risque associé à l'apparition des mutations de résistance. Les patients qui avaient des CV \geq 5000 copies/ml avaient deux fois plus de chance de développer les mutations T215F/Y.

Tableau XXI : Taux de lymphocytes T CD4 ≤ 350 cellules/mm³ comme facteur associé au risque d'apparition des mutations de résistance :

Les mutations de résistance	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
Y115F	4,5714	0,4320–48,3704
D67N	2,2857	0,6150–8,4954
M230L	2,2857	0,1482–35,2593
L100I	2,2857	0,1482–35,2593
V106A/I/M	1,1429	0,3747–3,4855

Un taux de CD4 ≤ 350 cellules/mm³ associé à l'apparition des mutations de résistance Les patients avaient des CD4 ≤ 350 cellules/mm³ avaient au moins deux fois plus de chance de développer les mutations ci-dessus excepter la mutation V106A/I/M.

Tableau XXII : La durée de traitement sous ARV > 36 mois comme facteur associé au risque d'apparition des mutations de résistance :

Les mutations de résistance	Risque ratio	Intervalle de confiance à 95%
T215Y/F	1,5714	0,6013–4,1070
K103N	1,6971	0,74 35–3,8738

Une durée de traitement > 36 mois apparait comme un facteur de risque associé à l'apparition des mutations de résistance. Les patients qui avaient une durée de traitement > 36 mois avaient 69% de chance de développer la mutation K103N.

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

6.1 Limites de notre étude :

Notre étude fait suite à un processus d'évaluation des conséquences de la longue durée sous traitement antirétroviral sans suivi virologique (charge virale plasmatique) chez des patients infectés par le VIH-1 et en échec de leurs traitements de première ligne après au moins 36 mois.

Cette étude était limitée d'une part par le fait que la durée de la virémie détectable sous traitement ARV n'était pas en mesure d'être déterminée avec précision à cause de la non faisabilité ou de la non disponibilité de la CV plasmatique dans tous les centres et d'autre part par l'absence d'information sur l'adhérence aux traitements ARV.

La force de l'étude était qu'aucune donnée sur la prévalence de base de la résistance du VIH aux antirétroviraux n'était disponible pour notre population d'étude. Cependant une prévalence de la résistance primaire à 7,9% était connue (79).

Le but de l'étude était de déterminer les profils de mutations de résistances chez les patients infectés par le VIH-1 sous traitement et en échec de leurs traitements de première ligne après au moins 36 mois.

Quatre vingt douze patients ayant reçu au moins une molécule parmi les trois classes d'ARV disponible (INTI, INNTI, IP) au Mali ont été inclus. Ces patients provenaient des centres de prise en charge des PVVIH de Bamako et de deux hôpitaux régionaux (hôpital Nianakoro Fomba de Ségou et l'hôpital Fousseini Dao de Kayes). Tous les patients avaient une CV récente réalisée au moment de la demande de test de génotypage et des taux de lymphocytes T CD4⁺ datant d'au plus 6 mois disponible sur la fiche de demande de génotypage adressée au laboratoire.

Les gènes de la TI et de la protéase de 92 patients ont été amplifiés afin de déterminer les mutations conférant de la résistance aux molécules antirétrovirales et de caractériser les sous-types de VIH-1 rencontrés dans notre population d'étude. Environ 82,61% des patients avaient au moins une mutation de résistance à une molécule d'ARV parmi les trois classes disponible au Mali et 17,39% n'avait aucune mutation de résistance à part des mutations mineures ou polymorphismes rendant résistant aux

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

Tipranavir. Ces mutations mineures ou polymorphismes pourrait s'expliquer par le sous-type viral qui est en général un recombinant ou une apparition précoce de la résistance de ces patients aux traitements ARV.

Au Cameroun l'étude réalisée sur les patients en échec de première ligne après 36±2 mois de traitement a montré que, parmi les 66 patients génotypés, 53 hébergeaient des virus résistants et 13 avaient des génotypes vierges soit 19,70% (80). D'autres études montrent des résultats similaires au Burkina Faso (7) et au Malawi (81).

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 multirésistance. La PCR utile pour l'analyse des polymorphismes de taille, reste toute fois 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) a été utilisé pour identifier les sous-types de VIH-1 rencontrés chez nos patients.

6.3 Données démographiques et biologiques :

Ces données ont été collectées à l'aide de la fiche de demande de test de génotypage adressée au laboratoire SEREFO où, les charges virales plasmatiques ont été réalisées.

Les femmes représentaient 60,9% de notre population d'étude. Ceci confirme la féminisation de l'infection à VIH en Afrique et particulièrement au Mali où les femmes représentent 1,5% du taux d'infection (82).

Ce résultat est en concordance avec d'autres études menées au Mali et au Cameroun où les taux de prévalence de l'infection à VIH-1 chez les femmes étaient de 67% et 72,9% respectivement (80,83).

Cependant dans la cohorte Mauritanienne, ils ont trouvé que 67,44% des patients en échec virologique était des hommes (84).

La tranche d'âge de 30-44 ans était la plus représentée avec 51,1% des patients. L'âge médian était de 33 ans avec des extrêmes de 4 et 52 ans. Ce résultat est comparable avec l'étude réalisée sur les patients en échec de 2^{ème} ligne au Mali où ils ont trouvé 35 ans comme âge médian (83). D'autres études réalisées en Afrique subsaharienne ont rapporté des médianes d'âges variantes : 31,5 au Mali, 38,5 au Malawi et 39 ans au Cameroun (80,81,85). Ces résultats montrent que l'infection à VIH touche de façon prédominante la population jeune sexuellement active.

Environ 39,13% de nos patients avait une durée de traitement sous ARV supérieure à 60 mois. La médiane de la durée de traitement sous ARV était de 50,5 mois avec des extrêmes de 36 et 131 mois. Nos patients avaient une expérience sous traitement ARV supérieure à ceux du Cameroun et du Malawi qui ont trouvé des médianes de 36,5 et 36±2 mois respectivement (80,81).

69,6% de nos patients avait un taux de lymphocyte T CD4⁺ inférieur à 350 cellules/mm³. La moyenne des lymphocytes T CD4⁺ était de 291,5 avec des extrêmes de 6 et 1319. Celle de la charge virale plasmatique était de 28266,5 copies/ml. Nos patients étaient en déficit immunitaire modéré. Les charges virales plasmatiques sont 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. L'étude du Malawi a rapporté une médiane des charges virales de l'ordre 52374 copies/ml et une médiane des lymphocytes T CD4⁺ de l'ordre de 68 cellules/mm³ (81). Ces patients sont en déficit immunitaires sévères comparés à nos patients mais avec une médiane de CV plasmatique relativement basse.

Nous n'avons pas pu suivre l'évolution du taux de lymphocyte T CD4⁺ et de la charge virale plasmatique chez nos patients. Cependant nous avons trouvé que, les patients qui avaient un taux de CD4 < 350 avaient une CV plasmatique élevée (> 5000 copies/ml) que ceux ayant un taux de CD4 > 350 (P < 0,01) ce résultat est en concordance avec celui de Dolo M (85).

Il aurait été intéressant de suivre l'évolution des paramètres biologiques chez ces patients ayant des mutations de résistance. Une étude de surveillance des paramètres biologiques a été réalisée au Mali et au Burkina Faso et a montré des mutations de résistances à 12 mois de traitement (7).

6.4 Le traitement antirétroviral :

La majorité de nos patients ont reçu la combinaison thérapeutique contenant 2 INTI + 1 INNTI (87%) et la combinaison 2 INTI + 1IP chez 13% comme première ligne de traitement. Les IP sont préférentiellement utilisés en deuxième intention (86,87). Leur usage en première intention pourrait

s'expliquer par leur puissance à rendre les CV plasmatiques indétectables plus rapidement d'une part et d'autre part par le fait que les IP ont une barrière génétique élevée à la résistance (83).

La combinaison à dose fixe Duovir[®]N (AZT + 3TC + NVP) a été le traitement le plus utilisé (36,96 % des patients) ainsi 68,18% des patients avaient reçu ce régime à 36 mois de traitement. La combinaison à dose fixe Triomune[®] (d4T +3TC + NVP) a été utilisée chez 30,43% des patients ainsi 27,78 des patients à plus de 60 mois de traitement étaient sous ce régime.

Cette baisse d'usage du d4T par rapport à l'AZT pourrait s'expliquer par le retrait progressif du d4T dans les régimes de première ligne chez les adultes et les adolescents comme le recommande l'OMS et la politique nationale (86,87).

Ce résultat est comparable à celui de l'étude réalisée au Mali et au Burkina qui a montré que la combinaison AZT+3TC+NVP était la plus prédominante (7). Par contre Dolo M, Hosseinipour et al ainsi qu'Aghogeng et al ont trouvé dans leurs études que la combinaison d4T +3TC + NVP était la plus utilisée (80,81,85).

6.5 Diversité génétique et sous-type de VIH-1 :

Le recombinant CRF02_AG était le plus prédominant dans notre population d'étude soit 58,7%, suivi du CRF30_0206 soit 8,70%. Cependant les sous-types n'ont pas été identifiés chez 8,70% des patients. D'autres études réalisées au Mali ont montré que le recombinant CRF02_AG était le sous type le plus prédominant (24,83).

Ces résultats confirment les études réalisées en Afrique de l'Ouest qui ont trouvé que ce recombinant était prédominant dans cette région Africaine (7,23,88). Le recombinant CRF02_AG est aussi prévalent au Cameroun (80).

Dans notre étude, le sous type CRF30_0206 qui est une recombinaison entre le CRF02_AG et le CRF06_cpx (89) vient en seconde position malgré que le sous-type CRF06_cpx semble être le second sous-type prédominant en Afrique de l'Ouest. Dans une étude menée au Niger, le CRF30_0206 apparaissait comme le troisième sous-type prédominant (90). Les sous-types A1, C, CRF01_AE, CRF06_cpx, CRF45_cpx, D, F2, G, et des URF ont été aussi rapportés chez nos patients.

6.6 Prévalence des mutations de résistance :

Nous avons observé une forte prévalence de la résistance après au moins 36 mois de traitement ARV. 82,61% des patients portaient au moins une mutation rendant résistance à au moins un médicament des trois classes d'ARV disponible au Mali. Cette forte prévalence de la résistance est probablement due à la longue durée sous traitement sans surveillance virologique. La prévalence de la résistance par classe thérapeutique était : 75% de résistance à au moins un INTI, 71,73% de résistance à au moins un INNTI et 2,17% de résistance aux IP. Cependant aucune mutation majeure n'a été identifiée chez 17,39% des patients, sauf des mutations mineures ou polymorphisme rendant la résistance au

tipranavir. 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 (5).

D'autres études réalisées chez les patients infectés par le VIH-1 et en échec de leurs traitements de première ligne après une durée médiane de 36 ± 2 mois et 36,5 mois ont montré des résultats suivants : au Cameroun 79,24% de résistance aux INTI+INNTI, 1,89% de résistance aux IP et 19,70% de génotype vierge (80) et au Malawi 93% de résistance aux INNTI et 81% de résistance aux INTI (81). Ces résultats suggèrent une surveillance régulière de la charge virale plasmatique et en cas d'échec de faire recours à la seconde ligne afin de limiter l'accumulation de mutations de résistance chez les patients prenant des molécules dont la barrière génétique est faible à la résistance.

6.6.1 Prévalence des mutations de résistance aux INTI :

Soixante quinze pourcent de nos patients était résistant à au moins un INTI. Une étude menée chez des patients en échec précoce après 6 mois de traitement a montré que 50% d'entre eux présentait des mutations de résistances au 3TC/FTC qui donnait un avantage de pouvoir utiliser les molécules d'INTI en deuxième ligne. Une autre étude menée chez des patients en échec tardif a montré la prédominance des TAMs et montre la difficulté de pouvoir recycler ces molécules en deuxième après un échec tardif sans suivi virologique (6,7). Une forte prévalence de la résistance aux INTI a été rapporté après 12 mois de traitement chez des patients Ougandais avec comme régime d4T/3TC/NVP (91).

La mutation M184V, conférant de la résistance aux FTC/3TC et à l'ABC était la plus fréquente avec 72,83% des cas. Dans l'étude du Malawi, ils ont rapporté que, 81% de leur population d'étude portait cette mutation (81). La mutation M41L a été identifiée chez 13,04% des patients, la K65R chez 4,13%, insertion au codon 69 chez 2,17%, la K70E/R et la L210W chez 8,70%, la T215F/Y chez 26,09%, la K219Q/E chez 5,43% des cas.

La prévalence des TAMs était de 11,78% qui est largement inférieure au résultat trouvé dans l'étude du Malawi (régime de 1^{ère} ligne différent) dans la quelle la prévalence des TAMs était de 56% (81).

Nos résultats sont en concordance avec d'autres études précédentes qui ont montré une faible prévalence des TAMs quand la FTC/3TC est combinée avec l'AZT/d4T, probablement due au développement de la mutation M184V qui freine la réplication virale (92). Cette faible prévalence des TAMs suggère que la plus part des INTI pourraient être utilisée en deuxième ligne de traitement.

Le complexe Q151M rendant une multirésistance à tous les inhibiteurs nucléosidiques de la TI sauf au TDF (qui est un inhibiteur nucléotidique) n'a été identifié chez aucun patient. Cependant 2,17% des patients portait une insertion au codon 69 entraînant une multirésistance à tous les INTI, inclut le TDF. L'étude menée au Malawi a montré un taux élevé du complexe Q151M soit 19,15% des patients et a montré aussi que son apparition était associé à l'un ou à l'autre des mutations suivant : K65R ou K70E.

Donc cette absence de ce complexe chez nos patients pourrait probablement s'expliquer par le fait que la plus part de nos patients ont reçu la combinaison AZT/D4T+FTC/3TC, dont l'usage entraine une faible apparition du complexe Q151M (92).

Une faible prévalence des mutations K65R et K70E a été trouvé chez nos patients : 4,13% et 8,70% respectivement ; ces données pourraient s'étendre par l'usage de l'AZT et du d4T et probablement par l'usage du ténofovir. L'usage du d4T est associé à une émergence de ces mutations K65R et K70E (81). L'usage du d4T est indépendamment associé à la mutation K65R dans notre étude. Cependant cette mutation commence à être identifiée dans les pays aux ressources limités ou la combinaison d4T/3TC/NVP est utilisé en première ligne (93,94).

6.6.2 Prévalence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI.

Dans les cas suivant, la fréquence de la résistance était supérieure à la fréquence d'exposition : ABC 25% de résistance pour 18,70% d'exposition, ddi 6,52% de résistance pour 1,09% d'exposition, TDF 15,22% de résistance pour 7,61% d'exposition. Ces résultats pourraient s'expliquer par la résistance croisée entre les INTI. Ces résultats sont similaires à ceux de Maiga et al au Mali (83).

Pour l'AZT, il y avait 52,17% d'exposition contre 31,52% de résistance, le d4T 45,65 d'exposition contre 33,70% de résistance le FTC/3TC 95,65% d'exposition contre 73,91% de résistance.

6.6.3 Prévalence des mutations de résistance aux INNTI :

Une prévalence élevée de la résistance aux INNTI a été retrouvée dans notre étude : 71,73% de résistance à la NVP, 67,57% de résistance à l'EFV (INNTI de première génération) et 32,52% de résistance à l'ETR, 47,83% 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 (95). 38% de résistance à l'ETR à été retrouvé chez les patients en échec de deuxième ligne au Mali (83).

Une autre étude menée au Mali a aussi rapporté que parmi les 320 patients en échecs à la NVP ou à

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

l'EFV, 22 et 29% était résistance à l'ETR et la RPV respectivement (96). Marcelin et al ont montré que l'exposition à la NVP était associée à une faible réponse virologique à l'ETR (62), qui est en concordance avec d'autres études qui ont montrées que la NVP plus tôt que l'EFV était associée à un nombre élevé de mutation à l'ETR. Cela supporte nos résultats puisque la plus part de nos patients ont été exposé à la NVP plutôt qu'à l'EFV.

La mutation K103N conférant de la résistance à la NVP et à l'EFV était la plus fréquente soit 34,78%. Aghokeng et al au Cameroun ont rapporté une forte prévalence de cette mutation, soit 34% (80).

Les mutations suivantes ont été aussi trouvé : G190A/S chez 14,13%, Y188L chez 8,70%, la Y181C/I/V chez 27,13%, la P225H chez 4,75%, la V179D chez 18,48%, la E138A/K chez 9,78%

La mutation E138A/K rendant résistance à la RPV avait une prévalence de 9,78% dans notre population d'étude. Cela pourrait expliquer la forte prévalence de la RPV par rapport à l'ETR. D'autres études précédentes au Mali, au Cameroun et en Malawi ont rapporté une prévalence nulle de cette mutation (80,81,83).

6.6.4 Prévalence de la résistance par rapport à l'exposition aux INNTI :

Le nombre de patients exposés à la NVP était légèrement supérieur au nombre de patients résistants, soit 76,09% contre 71,74%. 13,04% des patients ont été exposé à l'EFV avec 69,57% de résistance, aucun patient n'a été exposé à la RPV et à l'ETR cependant une résistance de l'ordre de 47,53% et 31,52% respectivement ont été rapporté.

Ces résultats confirment bien une forte résistance croisée entre les INNTI de première génération et de deuxième génération.

6.6.5 Prévalence de la résistance aux IP :

Nous avons observé une faible prévalence de la résistance aux IP (2,17%) dans notre population d'étude. Cela pourrait s'expliquer par la fait que les IP sont majoritairement utilisés en deuxième ligne de traitement or nos patients étaient sous traitement de première. Maiga et al dans leur étude sur les patients en échec de deuxième ligne ont rapporté 76% de résistance aux IP (83).

Les mutations associées aux IP rencontrées chez nos patients étaient : la K20M/R chez 7,61%, la L33I/L/V chez 1,09%, la G16E chez 7,61%, la L63P chez 6,52%, la H69K/R/Q, la M36I/L/V, la L89M/V/I chez 69,57% qui sont tous des mutations mineures ou polymorphiques.

Les mutations H69K/R/Q, M36I/L/V et L89M/V/I entrainant un haut niveau de résistance au tipranavir ont été retrouvées comme des polymorphismes naturels dans les sous-types non B et particulièrement le sous-type CRF02_AG (24). Nos résultats confirme ce résultat ou un haut niveau de résistance au tipranavir du aux mutations H69K/R/Q, M36I/L/V et L89M/V/I a été observé dans

notre population d'étude. Nous avons utilisés l'algorithme de l'ANRS qui donne résistance au Tipranavir pour les sous-types non B.

2,17% de nos patients était résistant au LPV contre 9,78% d'exposition, 1,09% de résistance à IDV contre 1,09% d'exposition. Cependant nous avons observé 1,09% de résistance au Darunavir (qui n'est pas encore utilisé dans les régimes au Mali) contre 0% d'exposition. Cela pourrait également expliquer une croisée entre les IP. Une autre étude menée au Mali a rapporté 12% de résistance au darunavir due à une résistance croisée avec le LPV (83).

6.7 Apparition des mutations en fonction de la durée sous traitement

Les mutations T215Y/F qui sont sélectionnées préférentiellement sous AZT/d4T étaient prévalentes chez les patients ayant plus de 60 mois sous traitement que ceux qui étaient seulement à 36 mois ($p < 0,01$).

De même la mutation Y181C conférant la résistance à l'EFV, à la NVP, à l'ETR et à la RPV était prévalente chez les patients ayant plus de 60 mois sous traitement que ceux qui étaient seulement à 36 mois ($p < 0,01$).

Et nous avons aussi observé une prévalence relativement élevée de la mutation M184V (conférant principalement de la résistance aux molécules 3TC, FTC et secondairement à l'ABC) chez les patients qui avaient plus de 60 mois sous traitement que ceux qui étaient seulement à 36 mois et la différence de la fréquence entre les deux périodes n'était pas statistiquement significative ($p < 0,41$).

6.8 Les facteurs de risque associés à la résistance, à l'élévation des CV plasmatique et à d'apparition des mutations de résistance :

Une CV plasmatique ≥ 5000 copies/ml était un facteur de risque associé à la résistance à l'ABC, à l'AZT, au d4T, au FTC/3TC, à l'ETR et à l'AZV avec des risque ratio de 2,2105, 1,8246, 1,9646, 1,2632, 1,2211, 1,8246 et 1,5263 respectivement et dans un intervalle de confiance de 95% (voir tableau 16). Ce risque était très faiblement associé à la résistance à la ddI, à la NVP, à l'EFV et à la RPV. Charles Kouanfack et al en 2009 ont montré qu'il y'avait plus de résistance aux ARV chez les patients ayant une CV > 10000 copies/ml que ceux dont les CV étaient situées entre 1000 et 10000 copies/ml.

Une étude menée en Afrique du Sud a rapporté qu'une CV plasmatique > 1000 copies/ml pourrait compromettre l'efficacité du traitement de seconde ligne avec un risque ratio de 1,24 (0,58-2,64) dans un intervalle de confiance de 95% (97).

Les mutations T215F/Y, Y188L, K103N, M184V, L210W, étaient associées aux CV plasmatique ≥ 5000 copies/ml avec des risque ratio respectifs : 2,3158, 1,4737, 1,4737, 1,356, 1,4737. Ce risque était faiblement associé à l'apparition de la mutation Y181C/I.

La longue durée sous traitement ARV (durée >36 mois) était un facteur associé à la résistance à l'ABC, à l'AZT, au d4T, au TDF et à la ddI avec des risques ratio de l'ordre de 1,4929, 1,5086, 1,3035, 1,8817, 1,5714 respectivement, avec un intervalle de confiance de 95%.

L'étude menée en Afrique du Sud a aussi rapporté qu'une durée d'échec aux ARV > 24 mois pourrait compromettre l'efficacité du traitement de deuxième ligne avec un risque ratio de 2,62 (0,32-21,23) (97).

L'apparition des mutations T215Y/F et K103N était associée à la longue durée sous traitement ARV (durée > 36 mois) avec des risque ratio respectifs : 1,5714, 1,6971.

La baisse des lymphocytes CD4⁺ (< 350 cellules/mm³) était associée à la résistance à la résistance à l'ABC, l'AZT, le d4T, le TDF et la TPV avec des risque ratio respectifs de 2,0781, 1,3750, 1,8229, 5,6875, 1,6875 à un intervalle de confiance de 95%. La résistance à la NVP, l'EFV, la RPV et l'ETR était très faiblement associée à la baisse des lymphocytes CD4.

La baisse des lymphocytes CD4 (< 350 cellules/mm³) était associée à l'apparition de certaines mutations de résistance comme : la Y115F, D67N, M 230L et la V106A/I/M.

Au Malawi, il a été rapporté que la baisse des CD4 (≤ 100 cellules/mm³) est fortement associée à une émergence des mutations K65R et K70E, l'émergence d'au moins 3 TAMs et l'émergence à la résistance au pan-nucléoside (81).

Les résultats des facteurs de risque sont statistiquement non significatifs. Ceci est probablement dû à la taille de notre échantillon. D'autres études avec une taille d'échantillonnage beaucoup plus large pourront donner des résultats significatifs.

7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS:

7.1 Conclusion

Le traitement antirétroviral a significativement réduit la mortalité et la morbidité des patients infectés par le VIH aussi bien dans les pays développés que dans les pays à ressources limités. Cependant les phénomènes de résistances aux traitements sont aujourd'hui un problème qui freine le succès thérapeutique et limite l'utilisation des molécules pour les schémas thérapeutiques ultérieurs.

La présente étude a porté sur 92 patients infectés par le VIH-1 et en échec virologique de leurs traitements antirétroviraux de première ligne après au moins 36 mois.

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. L'alignement et l'analyse des séquences ont été réalisés par des logiciels Sequencing Analysis puis Viroseq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Molecular).

La majorité de nos patients était des femmes soit 60,9%, et 51,1% des patients était dans la tranche d'âge de 30-44 ans avec une médiane d'âge de 33 ans.

Le régime Duovir N® (AZT+3TC+NVP) représentait 36,96% des schémas utilisés.

Nos patients avaient une durée moyenne de 50,5 mois sous traitement. La moyenne des CV plasmatique et des lymphocytes T CD4⁺ était de 28266,5 copies/ml et 291,5 cellules/mm³ respectivement.

La prévalence de la résistance aux INTI était de 75% essentiellement la FTC/3TC qui freine la réplication virale. Une forte prévalence de la résistance a été observé chez les INNTI soit 71,73%, et la résistance aux IP était de 2,17%.

Nous avons observé de la résistance de façon spécifique aux FTC/3TC (73,91%), à la NVP (71,73%) et l'EFV (67,57%). Et l'échec virologique était associé à un niveau élevé de résistance aux INNTI.

Ces résultats suggèrent que la plus part de nos patients devraient être mis sous deuxième ligne de traitement. Ces traitements de relai IP, TDF, ABC sont souvent compromis pour une utilisation en deuxième ligne. Ceci montre qu'un certain nombre de patients doivent quitter de 1^{ère} à 3^{ième} ligne de traitement.

Ces données nous montrent qu'il est donc important d'étendre le suivi des patients infectés par le VIH par les tests de charge virale et de vulgariser les test de résistance aux patients sous traitement de première ligne au long cours. Ceci permettra de prévenir l'émergence de la résistance chez ces patients.

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 Lute 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,

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

-Assurer l'accès des tests de génotypage aux patients en échec virologique de leurs traitements de première 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 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.

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

-Etre adhérent aux traitements pour un meilleur succès thérapeutique

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. **ONUSIDA.** Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida. [Internet]. Genève; 2012 p. 8–15. Available from: <http://www.unaids.org>
2. **Fleury HJ.** Abrégé de virologie humaine. 5ème édit. Masson, editor. 2009. p. 151–2.
3. **CPS/MS.** quatrième enquête démographique et de santé au Mali (EDSM-IV). Bamako (Mali); 2006.
4. **El-Sard WM, Lundgren JD NJ et al.** CD4 count -guided interruption of antiretroviral treatment. Strategies for management of antiretroviral therapy (SMART) Study Group. N Engl J Med. 2006;355(96):2283–96.
5. **Yeni P.** Prise en charge MÉDICALE des personnes infectées par le VIH. Paris; 2010 p. 32–60.
6. **Marcelin AG, Jarrouse A, Deracha A, Ba M, Dakouo ML DA et al.** HIV drug resistance after the use of generic fixed-dose combination stavudine/lamivudine/nevirapine as standard first-line regimen. AIDS. 2007;23:41–2.
7. **Sylla M, Chamberland A, Boileau C, Traore HA, Ag Aboubacrine S, Cisse M et al.** Characterisation of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. Antivir Ther. 2008;13:141–8.
8. **Dagnra AY, Vidal N, Mensah A, Patassi A, Aho K, Salou M et al.** High prevalence of HIV-1 among patients on first-line antiretroviral treatment in Lomé Togo. AIDS. 2011;30.
9. **Montagnier L et col.** SIDA et infection par le VIH. Flammarion. Science M, editor. Paris; 1989.

10. **CDC. CfDC.** Epidemiological aspects of the current out break of kaposi sarkoma and opportuniste infection. N Engl J Med. 1982;248–52.
11. **Jean-Marie Huraux, Jean-Claude Nicolas, Henri Agut HP-L.** TRAITE DE VIROLOGIE MADICALE. ESTM. Paris; 2003. p. 319–29.
12. **ISBS.** Enquete integrée sur la prévalence des IST/VIH et les comprtements au sein des groupes à risques au Mali. Mali; 2006.
13. **SP G.** Retroviridae: the retroviruses and their replication. in: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 5th edition. philadelphia: lippincott-raven Philadelphia; 2007. p. 1999–2071.
14. **Gallo R.** History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. ONCOGENE. 2005;24:5926–30.
15. **Mathieux R GA.** New human retroviruses:HTLV-3 and HTLV-4. Med Trop. 2005;65:525–8.
16. **Bagossi P, Bozosi B TJ.** Discorvery and significance on new human T-lymphotropic viruses: HTLV-3 and HTLV-4. Expert REV anti Infect ther. 2009;7:1235–49.
17. **Barre-sinoussi F.** The early years of HIV research: integrating and basic research. Nat Med. 2003;9:844–6.
18. **Courgnaud V, Muller- trutwin M SP.** Evolution and virulence of primate lentiviruses. Med sci. 2004;20:448–52.
19. **Gordon S, Pandrea I DR.** The calls of the wild: wath can be learned from studies of SIV infection of natural host? HIV sequen. Leitner T, Foley B HB et al, editor. LOS ALMOS: Los Almos: theoretical biology and biophysics group; 2005. p. 2–29.
20. **Khan AS.** Simian foamy virus infections in humans: prevalence and management. Expert REV anti Infect ther. 2009;7:569–80.
21. **Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prevost MC, Allen TD and CP.** HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. Embo J. 2007;26(12):3025–37.
22. **Raphael W. Lihana, Deogratius Ssemwanga AA et NN.** Update on HIV-1 Diversity in Africa : A Decade in Review. AIDS. 2012;14(23):83–100.
23. **Roquebert B, Damond F, Brun-Vizinet DD.** HIV genetic diversity and its consequences. Pathol Biol. 2009;57:142–8.
24. **Derache A.** Etude des bases moléculaires de la résistance du VIH-1 de sous-type non B aux ARV. Thèse de Doctorat PhD à l'Université Pierre et Marie Curie Paris 6; 2009.
25. **Barbara S, Taylor MD, Magdalene E S.** The challenge of HVI-1 subtype diversity. NEJM. 2008;358:1590–602.

26. **Coulibaly K.** Genotypage et exploration du polymorphisme nucleotidique du CCR5, recepteur de chimiokines et corecepteur majeur du VIH-1. de Bamako; 05-M-38.
27. **Vessiere A, Rousset D Kfutwah A et al.** Diagnosis and monitoring of HIV-1 groupe O infected patients in Cameroun. *J Acquir Immune Defic.Syndr.* 2010;53:107–10.
28. **Klatzmann D, Champagne E, Charamet S, Guetard D HT.** T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 1984;312:767–8.
29. **Dorans BJ, Berson JF, Rucker J DR.** Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type-1(HIV-1). *Immunol.* 1997;16:15–28.
30. **Levy JA.** Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol.* 1993;57:183–289.
31. **Pierre-Marie Girad, Christine Katlama GP.** VIH 2011. Doin 2011. Doin, editor. 2011. p. 65–65.
32. **Plantier JC, Djemai M L V.** Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 groupe O. *J clin Microbiol.* 2009;47(9):2906–11.
33. **Chun TW FA.** latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Nath Acad Sci USA.* 1999;96:10958–61.
34. **Ho DD, Moudgil T AM.** Quantification of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med.* 1989;321:1621–5.
35. **Van Gemen B, Kievits T NP.** Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid and sequence-based amplification. *AIDS.* 1993;7(2):107–10.
36. **Bogard M LJ.** Biologie moléculaire et biologie clinique. Tome 1 Els. Paris; 1998.
37. **Holodniy M, Katzenskein DA, Sengupta S and al.** Detection and quantification of HIV RNA in patients serum by use of the polymerase chain reaction. *J Infec Did.* 1990;163:862–6.
38. **Cave H, Acquaviva C, Bieche I, Brault D, de Fraipont F FF and al.** RT-PCR in clinical diagnosis. *Ann Brol Clin.* 2003;61:635–44.
39. **Génet.** Les outils de génétique moléculaire [consulté le 05/03/2013]. Available from: <http://genet.univ.tours.fr>
40. **Dembele D.** Cours de bioinformatique. Strasbourg France; 2005.
41. **Charlotte Lewden.** Time with CD4 cell count above 500 cells/mm³ allows HIV-infected Men, but not women, to reach similar mortality rates to those of the general population: 7-year analysis. SAN FRANCISCO; 2010.

42. **Eron J and al.** Characterization of the resistance profile of TMC 278:48-week analysis of the phase III studies ECHO and THRWE. ICAAC. 2010.
43. **Eron J and al.** DTG in subjects with HIV exhibiting RAL resistance: functional monotherapy results of viking study cohort II. 2011.
44. **Nowicka-Sans B et al.** Antiviral activity of a new small molecule HIV-1 attachment inhibitor, BMS - 626529, the parent of BMS- 663068. 2011.
45. **Gallant JE, Dejesus E AJ et al.** Tenofovir DF, Emtricitabine, and Efavirenz vs Zidovudine, Lamivudine, and Efavirenz for HIV. N Engl J Med. 2006;354(3):251–60.
46. **Arrabis JR, Pozniak AL GJ et al.** Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naïve patient:144 week analysis. J Acquir Immune Defic.Syndr. 2008;47(1):74–8.
47. **Dejesus E, Herrera G TE et al.** Abacavir versus zidovudine combined with lamivudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naïve HIV-infected adults (in process citation). Clinical Infectious Diseases. 2004;39(7):1038–146.
48. **Moyle GJ, Dejesus E, Cahn P et al.** Abacavir once or twice daily combined with once-daily lamivudine and efavirenz for the treatment of antiretroviral-naïve HIV-infected adults: results of the ziagen one-daily in antiretroviral combinations study. J Acquir Immune Defic.Syndr. 2005;38(4):417–25.
49. **Smith KY, Patel P, Fine D et al.** Randomized, double-blind placebo-matched, multicenter trial of abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with lopinavir/ritonavir for initial HIV treatment. AIDS. 2009;23(12):1547–56.
50. **Riddler SA, Haubrich R, Di Rienzo AG et al.** Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. N Engl J Med. 2008;358(20):2095–106.
51. **MS/SG/CSLS.** Politique et protocoles de prise en charge antirétroviral du VIH et du SIDA. Bamako (Mali); 2010 p. 27–39.
52. **Gazzola L, Tincati C, Bellistri GH et al.** The absence of CD4 T cell count recovery despite receipt of virological suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. Clinical Infectious Diseases. 2009;48(3):328–37.
53. **Castagna A, Danise A, Menzo S et al.** Lamivudine monotherapy in HIV-1 infected patients harbouring a lamivudine resistance virus: a randomized pilot study (E-184V study). AIDS. 2006;20:795–803.
54. **Larder BA, Darby G RD.** HIV with reduced sensitivity zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. Science. 1989;243:1731–4.
55. **Françoise Brun-Vizinet, Charlotte Charpentier DD.** Résistance aux antirétroviraux. In: Doin, editor. VIH. 2011th ed. Paris; 2011. p. 461–80.

56. **Picard V, Angelini E MA et al.** Comparaison 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;184:781–4.
57. **Calvez V, Costagliola D DD 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;7:211–8.
58. **Gotte M, Arion D, Parniak MA et al.** The M184V mutations in the RT of HIV-1 impairs rescues of chain terminated DNA synthesis. *J virol.* 2002;47:3579–85.
59. **Tamalet C et al.** Choix d'une combinaison fixe d'inhibiteurs nucléosidiques en vue du traitement initial d'une infection à VIH: apport des données virologiques. *Revue virologique.* 2006;10(333-40).
60. **Tambuyer L, Vingerhoets J, Azijn H et al.** Characterization of genotypic and phenotypic changes in HIV-1 infected patients with virological failure on an etravirine -containing regimen in the DUET-1 and DUET-2 clinical studies. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2010;26:1197–205.
61. **Azijn H, Terry I, Vingerhoets J et al.** TMC 278, a next- generation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistance HIV-1. *Antimicrob Agents chemother.* 2010;54:718–27.
62. **Marcelin AG, Flandre P, Descamps D et al.** Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1 infected patients. *Antimicrob Agents chemother.* 2010;54(72-7).
63. **Von Wyl V, Yerly S BJ et al.** Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combinaison antiretroviral treatment: a comparaison of different regimen types. *Arch Intern Med.* 2007;167:1782–90.
64. **Pokorna et al.** Principales position des mutations de résistance aux IP. 2009
65. **Sista P, Melby T, Greenberg ML et al.** Characterization of baseline and traitment emergent resistance to T-20 (enfuvirtide) observed in phase III clinical trials: substitutions in gp 41 amino acids 36-45 and enfuvirtide susceptibility of virus isolates. *Antivir Ther.* 2002;7:S16.
66. **Moore JP KD.** A piece of resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr opin HIV AIDS.* 2009;4:118–24.
67. **Cooper DA et al.** Maraviroc versus efavirenz, both in combinaison with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010;803–13.
68. **Raymond S et al.** Developpement and performance of a new recombinant virus phenotypic enter essay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J clin virol.* 2010;47:126–30.

69. **Lengauer T et al.** Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol.* 2007;27:1407–10.
70. **Raymond S et al.** Genotypic prediction of HIV-1 CRF02_AG tropism. *J clin Microbiol.* 2009;47:2292–4.
71. **Fransen S, Gupta S DR et al.** Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. *J virol.* 2009;83:11440–6.
72. **Shimura K, Kodama E S y et al.** Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J virol.* 2008;82:764–74.
73. **Descamp D, Delaugerre C, Masquelier B et al.** Repeated HIV-1 resistance genotyping external quality control assessments improve virology laboratory performance. *J Med.* 2006;78:153–60.
74. **Aliou Sylla.** Lettre d'information sur la disponibilité d'un appareil de génotypage. Bamako (Mali); 2008.
75. **Abbott.** Guide abrégé de préparation manuelle des échantillons pour les dosages abbott Real Time HIV/HCV. Germany: Abbott; 2010. Available from: <http://www.abbottmolecular.com>
76. **Abbott.** Viroseq™. HIV-1 Genotyping System v2.0. Germany: Abbott; 2006. p. 1–15. Available from: <http://www.abbottmolecular.com>
77. **Mukaide M et al.** Evaluation of Viroseq HIV-1 version 2 for HIV-1 drug resistance. *Jpn J Infect Dis.* 2009;53:203–5.
78. **Cunningham S et al.** Performance of the Applied Biosystem Viroseq in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples. *J clin Microbiol.* 2001;39:1254–7.
79. **Maiga A I, Fofana B D, Maiga A C, Diallo F, Arkoub Z A, Daou F et al.** Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in Newly HIV-Infected and Untreated Patients. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES.* 2012;28(00).
80. **Aghokeng A.F, Kouanfack C, Eymard-Duvernay S, Butel C, Edoul G.E, Laurent C et al.** Short report Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon. *JIAS [Internet].* 2013;16(1):8. Available from: <http://www.jiasociety.org/index.php/jias/article/view/18004>
81. **Mina c . hosseinipour, Joep J.G.van Oosterhout RW 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.* 2009;23(9):1127–34.

82. **CSLS/CDC.** Integrated Sexually transmitted diseases prevalence and Behavioral Survey in Mali (ISBS). Bamako (Mali); 2006.
83. **Maiga A.I, Maiga M.Y, Fofana D.B et al.** Characterization of HIV-1 antiretroviral drug resistance after second-line treatment failure in Mali , a limited-resources setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;
84. **Z. Fall Malick, S.A. Ould Soufiana, H. Diop-Ndiaye et al.** Résistance secondaire aux antirétroviraux et diversité génétique chez les patients VIH1 mauritaniens de la cohorte nationale. *Antiviral Therapy and Infectious Diseases.* 2013;4.
85. **Dollo Mariam Dolo.** Evaluation de la charge virale plasmatique et du taux de lymphocyte TCD4 chez une cohorte de 930 patients sous ARV suivi sur 18 mois au laboratoire Privé ALGI à Bamako (Mali). *Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie;* 2011. p. 60.
86. **MS/SG/CSLS.** Politique et protocole de prise en charge antirétrovirale du VIH et du SIDA. Bamako (Mali); 2010 p. 28.
87. **OMS.** Lignes directrices combinées sur l'utilisation des antirétroviraux pour le traitement et la prise en charge de l'infection à VIH. Genève; 2013. Available from: <http://www.who.int>
88. **Hanson DL, Adjé-Toure C, Talla-Nzussouo N, Eby P, Borget MY, Kouadoi LY et al.** HIV type 1 drug resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2009;25:489–95.
89. **Sylla. M et al.** CRF30_0206 [le 10/08/2013]. 2003 . Available from: www.hiv.lanl.gov
90. **Marcelin A.G.** Résistance primaire au Niger [Internet]. 2009 [cited 1BC Sep 2]. Available from: <http://www.soltis.org>
91. **Kamya MR, Mayanja-Kissa H, Kambugu A, Bakeera-Kitaka S et al.** Predictors of long-term virological failure among Ugandan children and adults treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic.Sydr.* 2007;46:187–93.
92. **Mouroux M, Descamps D, Izopet J YA et al.** Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy. *Antivir Ther.* 2001;6(3):179–83.
93. **Marconi VC, Sunpath H, Lu z et al.** prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in Kwazulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1589–97.
94. **Sungkanupart S, Manosuthi W, Kiertiburanakul S et al.** Options of a second-line antiretroviral regimen for HIV type 1-infected patients whose initial regimen of a fixed dose combination of stavudine, lamivudine, nevirapine fails. *Clin Infect Dis.* 2007;44(447-52).

95. **Bunupuradah T, Ananworanich J, Chetchotisakd et al.** Etravirine and rilpivirine resistance in HIV-1 subtype CRF01_AE-infected adults failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens. *Antiviral therapy*. 16(7):1113–21.2011
96. **Maiga A. I, Daou. F, Balde. A, Fofana D.B, Traore. B, Maiga M.Y et al.** 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. Bamako (Mali); 2013.
97. **ManasaJ, Lessells RJ, Skingsley A et al.** High-levels of Acquired Drug Resistance in Adult Patients Failing First-Line Antiretroviral Therapy IN Rural HIV Treatment Programme in KwaZulu-Natal, South Africa. *journal.pone* 0072152. 2013

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : DIAWARA

Prénom : Moussa

Nationalité : Malienne

Numéro de téléphone : (+223) 73 35 50 06

E-mail : moussadiaw13@gmail.com

Titre de la thèse : «Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois»

Année universitaire : 2012-2013

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 :

L'émergence et le développement de la résistance aux antirétroviraux était à craindre chez les patients infectés par le VIH-1 ayant au moins 36 mois sous traitement de première ligne chez lesquels, le changement de traitement était basé sur la clinique et la numération des lymphocytes T CD4 et non sur la charge virale plasmatique à cause de sa non disponibilité ou sa disponibilité irrégulière. Le but de notre étude était de mesurer la prévalence de la résistance aux antirétroviraux chez les patients ayant au moins 36 mois de traitement antirétroviral. Nous avons conduit une étude transversale prospective allant de la période de Février 2012 à Mars 2013 chez des patients en échec virologique (charge viral ≥ 1000 copies/ml). Des échantillons de sang ont été collectés pour la quantification de l'ARN VIH-1 et le test de résistance génotypique pour ces patients.

Notre étude nous a permis de réaliser les tests de résistance chez 92 patients sur les 102 patients en échec virologique (CV ≥ 1000 copies/ml). Environ 60,90 % de nos patients était des femmes. Les médianes d'âge, de CD4, de la CV et de la durée de traitement étaient respectivement de 33 ans, 291,5 cellules/mm³, 28266,5 copies/ml et 50,5 mois. Les patients provenaient des centres de prises en charge des PV VIH de Bamako, de l'hôpital de Ségou et de l'hôpital de Kayes. La majorité des patients était sous régime Duovir[®] N (AZT + 3TC + NVP) soit 36,96%. Le recombinaut CRF02_AG était le sous-type de VIH-1 le plus prédominant, suivi du CRF30_0206. Environ 82,61% des patients portaient une mutation majeure rendant résistant à au moins une molécule parmi les trois classes d'ARV utilisées au Mali. La prévalence de la résistance aux différentes classes d'ARV comme suit : 75% de résistance aux INTI, avec comme mutation fréquente la M184V (72,83% des patients), 71,73% de résistance au INNTI avec comme mutation fréquente la K1 03N (34,78%), 2,17% de résistance aux IP. La prévalence des TAMs était relativement faible environ 11,78% et une forte résistance croisée a été observé entre les INNTI de première génération et ceux de deuxième génération.

Environ 86,61% de nos patients était sous traitement suboptimal et devrait être mis sous traitement de deuxième ligne. Ces données nous montrent qu'il est donc important d'étendre le suivi des patients infectés par le VIH par les tests de charge virale et de vulgariser les test de génotypage de résistance aux patients sous traitement de première ligne au long cours. Ceci permettra de prévenir l'émergence de la résistance chez ces patients.

Mots clés : VIH-1, échec virologique, ARV, mutations de résistance, Mali

ABSTRACT

The emergence and development of antiretroviral resistant was fear in HIV-1 infected patients who had at least 36 month of first_line antiretroviral therapy, in this population, antiretroviral treatment management was based on clinical and numeration of CD4 cell count and not HIV RNA viral load test who was not available. The aim of our study was to determine

the prevalence of antiretroviral resistant in HVI-1 infected patients who had at least 36 month of ART. We conducted a cross-sectional study during the period from February 2012 to Mars 2013. Blood samples were collected for HIV RNA viral load (VL) testing and drug resistance testing mutation when HIV-1 RNA \geq 1000 copies/ml.

In our study we performed 92 genotyping test among the 102 patients who were failing. Approx 60,90 % of patients was women and the median (interquartile range) age, CD4 , VL and ART duration were 33 years, 291,5 cell count, 28266,5 copies/ml and 50,5 months respectively. Our came were from HIV clinical care centers of Bamako, Segou and Kayes hospital. The majority of patients were under Duovir[®]N (AZT+3TC+NVP) regimen. CRF02_AG recombinant form was majority of HIV-1 subtype followed by CRF30_0206. Approx 82,61% of patients had at least one major mutation that can lead drug résistance to at least one ARV among the third ARV classes available in Mali. The prevalence of resistance was: 75% of patients was resistant to NRTI, principally M184V mutation (72,83%); 71,73% of patients was resistant to NNRTI, principally K103N mutation (37,78%) and 2,17% of patients was resistant to PI. The prevalence of TAMs was low (11,78%). And we found an important cross-resistant between NNRTI of first-generation and NNRTI of second-generation.

Approx 82,61% of patients was under a suboptimal ART and should be under second-ligne regimen. These data show that it is important to extend the monitoring of patients infected by HIV RNA viral load tests and popularize genotyping test of resistance for patients failing to first-line treatment in the long term. This will prevent the emergence of resistance in this population

Keys words: HIV-1, Virological Failure, Resistant Mutation and Mali



Université des Sciences des techniques et des technologies
de Bamako(USTTB) / NIH – USA

Praticiens responsables : Pr. Ousmane KOITA et Dr. Almoustapha I. MAIGA

GENOTYPE de RESISTANCE du VIH – 1

PATIENT	PRESCRIPTEUR	PRELEVEUR
Nom :	Nom :	Nom :
Prénom :	Tél. :	Date :

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

Age :	Centre/Service :	Heure :
Adresse /Tél. :	
No. Dossier :	SIGNATURE ET CACHET	
Sexe : M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		

Type de Prélèvement : 1 tube EDTA de 7 ml (bouchon violet)

MOTIF DE LA DEMANDE

- Echappement : 2^{ème} ligne
 - 3^{ème} à 5^{ème} ligne
 - > 5 lignes
- Protocole : non oui, lequel ?
- Statut VIH1 VIH1 + VIH2

RENSEIGNEMENTS :

Traitement anti-VIH de 2^{ème} ligne : depuis le :

Traitement anti-VIH de 1^{ère} ligne : du au

Arrêt du traitement par le médecin : du au

Arrêt du traitement par le patient : du au

Dernier suivi pharmacologique si disponible : le/...../.....

Dernière charge virale inférieure à 15 jours

Résultat Date :

Dernière valeur CD4 : Résultat Date :

Intolérance sévère aux ARV

Co-infection : VHC VHB TB Autres :

Remarques:

.....

.....

.....

TOUTES MOLECULES ANTIRETROVIRALES PRESCRITES AUPARAVANT (historique) :

- | | | |
|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AZT (Zidovudine) | <input type="checkbox"/> Saquinavir | <input type="checkbox"/> Efavirenz |
| <input type="checkbox"/> ddl (Didanosine) | <input type="checkbox"/> Ritonavir | <input type="checkbox"/> Nevirapine |
| <input type="checkbox"/> 3TC (Lamivudine) | <input type="checkbox"/> Indinavir | |
| <input type="checkbox"/> FTC (Entricitabine) | <input type="checkbox"/> Lopinavir /r | |
| <input type="checkbox"/> ABC (Abacavir) | | |
| <input type="checkbox"/> D4T (Stavudine) | | <input type="checkbox"/> Autre : |
| <input type="checkbox"/> CBV (Combivir®) | | |

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

ρ TZV (Trizivir®)

ρ TDF (Tenofovir)

ρ D4T + 3TC + NVP (Triomune®)

Consentement à participer à une étude de recherche

Titre de l'étude

EVALUATION IMMUNO-VIROLOGIQUE DES ECHECS DES TRAITEMENTS ARV DE PREMIERE LIGNE 3 ANS
CHEZ LES PATIENTS INFECTES PAR LE HIV-1 AU MALI

Nom du volontaire : _____

Prénom

Deuxième prénom

Nom de famille

Adresse : _____

Âge : _____ / en années

Numéro d'identification de l'étude : ____ - ____ - ____

Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche commanditée par le le centre de recherche et de formation sur le VIH et la tuberculose « SEREFO » et menée au Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE, au CESAC de Bamako, dans différents USAC a Bamako et dans trois de Kayes, Sikasso, Ségou et Mopti Il est important que vous compreniez plusieurs points qui s'appliquent à chaque personne participant à cette étude :

1. Votre participation à cette étude est entièrement volontaire.
2. Vous pouvez cesser de participer à l'étude à tout moment.
3. Vous ne perdrez aucun avantage thérapeutique si vous décidez de ne pas participer à cette étude.
4. Votre médecin et vous-même serez informés de tout résultat touchant votre santé ou pertinent pour vos soins.