

Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement  
Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

\*\*\*\*\*



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES  
TECHNOLOGIES DE BAMAKO

*Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie*

**FMOS**

Année universitaire : 2020/2021

**THESE**

Thèse N° : ... /...

**ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ARV  
CHEZ LES ENFANTS DE PLUS DE 10 ANS  
SOUS TARV DANS LES SITES DES 4 PAYS  
DU RESEAU EVA**

Présentée et soutenue publiquement le 29 12 / 2021 devant la

Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie.

**M. Sory KEITA**

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

**(DIPLOME D'ETAT)**

**JURY**

Président : Pr Abdoul Aziz DIAKITE

Membres : Pr Amadou Koné

Dr Yacouba Aba COULIBALY

Co-directeur : Dr Bassirou Diarra

Directeur : Pr Almoustapha Issiaka MAIGA

## **DEDICACE**

Ce travail est dédié :

### **A Allah le tout puissant.**

Dieu, le Miséricordieux, nous vous remercions pour nous avoir permis de réaliser ce modeste travail. Accordez-nous votre amour, votre grâce, votre fidélité, votre miséricorde, votre pardon afin que nous puissions avoir la paix éternelle.

### **A mon grand-père : Daouda DIAKITE**

Votre sens de la dignité et de la persévérance dans l'accomplissement de vos tâches nous a toujours inspiré. Nous aurions été très heureux que vous soyez à nos côtés ce jour solennel. Mais le tout puissant en a décidé autrement. Puisse Allah vous garder éternellement dans sa miséricorde. Amen !

### **A ma grande mère**

Tu as consenti beaucoup d'efforts pour la réussite à tes petits-enfants ; tes encouragements, ton soutien tant moral que matériel, ta patience et ton optimisme dans la vie, ont fait de toi une grande mère exemplaire. Cette thèse n'est qu'un témoignage de notre reconnaissance et nous souhaitons être digne de ta confiance et de ton estime. Que le tout puissant t'accorde une longue vie.

### **A mon père Nandiara KEITA**

### **A ma mère Ténébakoro DIAKITE**

Toi qui a dirigé mes premiers pas, toi qui à chaque instant de mon évolution a été présente, ce travail te revient intégralement. Tu t'es investie corps et âme pour la réussite de tes enfants. En reconnaissance de la tendre affection que tu n'as cessé de nous donner et en témoignage de notre indéfectible attachement ; puisse ce travail t'apporter une satisfaction légitime. Que Dieu te garde longtemps à nos côtés. Amen !

### **A ma Femme Salimata KEITA**

Merci de ta patience et de ta fidélité. Tu as été un soutien considérable pendant l'élaboration de cette thèse. Sache que la vie d'un médecin est faite de sacrifices

et de don de soi. Nous allons œuvrer ensemble dans le meilleur et le pire des cas. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et de ma fidélité. Que dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

**A ma belle famille**

Merci de m'avoir donné une épouse fidèle, attentionnée et compréhensive.

**A ma fille Aichata KEITA**

Qui doit s'estimer heureuse car ta venue a coïncidé avec ma soutenance.

Malgré toutes les difficultés rencontrées, que ce travail te serve d'exemple pour le futur.

**A mes frères et sœurs :**

Zoumana, Daba, Mamourou, Fatoumata, unis pour la vie, ce travail est l'accomplissement d'un de nos rêves. Vos conseils et votre soutien ne m'ont jamais fait défaut. Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance (amour fraternel).

**A mes cousins et cousines :**

-----

Plus que des cousins, nous sommes également des frères et sœurs, que nos liens se consolident davantage. Ce travail est le vôtre.

**A tout le personnel de laboratoire SEREFO / UCRC**

Je ne peux exprimer à travers ses quelques lignes tous les sentiments d'amour, de respect et de reconnaissance que je vous porte. Vous avez été une source de courage, de motivation et de force pour moi. Ce travail est le vôtre. Je prie toujours Dieu pour qu'il vous apporte le bonheur, la joie de vivre et vous aide à réaliser tous vos vœux. AMEN

## REMERCIEMENTS

A tout le corps professoral de la **FMOS-FAPH**.

**A mes maitres formateurs :**

**Pr Almoustapha I MAIGA, Pr DIALLO, Dr Josué TOGO, Dr Traoré Fatoumata, Dr Kodio Ahmed.** Vous avez été plus que des maîtres pour moi, trouvez en ce document le fruit de vos propres efforts.

**Aux thésards de laboratoire SEREFO/UCRC :** Coulibaly Youssouf, Ornella Tra, Lydie Poudiougou.

Merci pour votre franche collaboration.

**A tout le personnel médical et infirmier du CScom de Bozola**

**A mon logeur et Tonton Djigui Diakité :** Vous m'avez hebergé durant tout mon cycle, toute ma gratitude pour votre hospitalité.

**A mes Tantes :** Korotoumou Koné, Fatoumata Diakité, Nana Diakité, Aichata Traoré.

**A tous mes amis :** Mamadou Traoré, Issa Traoré, Mamoutou Djiré, Ana Maiga, Mariam Keita, Moussa Sissoko, Hamala Traoré.

L'amitié n'a pas de prix. Je ne saurai vous remercier. Mon amitié pour vous sera votre récompense.

## **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre Maître et Présidente du jury**

**Professeur Mariam SYLLA**

- ✓ **Professeur Titulaire de pédiatrie**
- ✓ **Responsable du centre d'excellence pédiatrique de prise en charge des enfants séropositifs au VIH au CHU Gabriel Toure.**
- ✓ **Coordinatrice du D.E.S de pédiatrie.**
- ✓ **Présidente de l'Association Malienne de Pédiatrie (AMAPED).**
- ✓ **Présidente de l'Association Kangourou Mali (AKM).**
- ✓ **Présidente du Réseau Enfant et VIH en Afrique (EVA).**
- ✓ **Vice doyenne de la Faculté de médecine et odontostomatologie (FMOS)**

**Cher maître,**

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

Votre abord facile, votre esprit critique, votre rigueur scientifique associé à vos qualités humaines font de vous un maître respecté et admirable.

Veillez agréer cher maître, l'expression de notre profonde gratitude et de notre attachement indéfectible.

**A notre Maitre et Juge**

**Professeur Amadou KONE**

- ✓ **Docteur en Biologie Cellulaire et Moléculaire, Immunologie**
- ✓ **Enseignant-chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques, Bamako Mali**
- ✓ **Chef de Laboratoire Unité Biologie Moléculaire à SEREFO/UCRC Bamako Mali**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.

Vos nombreuses qualités humaines ,votre générosité,votre simplicité,votre amabilité,votre rigueur dans la démarche scientifique nous ont beaucoup marqué.

Merci aussi pour votre contribution à l'amélioration de ce travail.

**A notre Maître et juge**

**Dr Yacouba Aba COULIBALY**

- ✓ **Médecin pédiatre au CHU du Gabriel Touré**
- ✓ **Titulaire d'un master en santé publique option épidémiologie**
- ✓ **Pédiatre responsable de la prise en charge des enfants infectés par le VIH au centre d'excellence pédiatrique du CHU du Gabriel Touré**

Cher Maître, Accepter de juger ce travail, nous gratifie car vous l'avez fait malgré vos multiples préoccupations. Homme de principe, votre rigueur scientifique est connue de tous. Votre souci du travail bien fait nous a amené à croire à nos propres capacités. Nous voulons en ce jour, vous témoigner l'expression de notre profonde gratitude.

**A notre Maître et co-directeur de thèse**

**Dr Bassirou Diarra**

- ✓ **Médecin,**
- ✓ **Maitre-Assistant à la FMOS de l'USTTB,**
- ✓ **Titulaire d'un Master en Médecine Tropicale de l'Université de Nagasaki au Japon,**
- ✓ **Titulaire de PhD à l'Institut de Médecine Tropicale et l'Université d'Anvers en Belgique,**
- ✓ **Senior chercheur et Responsable du laboratoire P3 de Tuberculose et des Fièvres Hémorragiques de l'UCRC**
- ✓ **Membre de l'équipe d'intervention rapide de la CEDEAO contre les fièvres Hémorragiques**

**Cher Maître,**

Nous sommes ravis de l'honneur que vous nous faites en acceptant de co-diriger ce travail. Nous avons été marqués par votre simplicité, votre disponibilité et votre modestie. Vos qualités humaines et surtout votre culture pour la science nous ont impressionnés. Les valeurs professionnelles et scientifiques dont vous êtes porteur ainsi que votre courage ont forgé notre estime et notre admiration en vous. Veuillez recevoir notre profonde reconnaissance.



**A notre maître et directeur de thèse**

**Pr Almoustapha Issiaka MAIGA**

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

**Honorable maître,**

C'est un privilège et un grand honneur que vous nous avez fait en acceptant de diriger ce travail. Vos compétences professionnelles, vos qualités scientifiques et humaines, votre simplicité, votre amabilité, font de vous un maître unique. Recevez cher maître avec tout le respect et toutes les considérations nos humbles remerciements,

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

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  
DPS: dried plasma spot  
EFV: Efavirenz  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
EDS M-V: enquête démographique ET santé du Mali V  
Env.: Enveloppe  
ETR : Etravirine  
EVA : enfant et VIH en Afrique  
EVAm : enfant et VIH au Mali  
EVAci : enfant et VIH en côte d'ivoire  
EVAs : enfant et VIH Sénégal  
EVAb : enfant et VIH Burkina Faso  
FTC : Emtricitabine  
Gag: group antigène  
gp: glycoprotéine  
HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy  
IDV: Indinavir

IMAARV: Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux  
INI : Inhibiteur d'Intégrase  
INT : Inhibiteur Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse  
INNTI : Inhibiteur Non-nucléosidiques 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  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
Pol: «polymerase»  
PVVIH: Personne Vivant avec le Virus de l'immunodéficience Humaine  
PR: protease  
Rev: «regulator of virion expression»  
RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction  
RT : revers transcriptase  
SQV : Saquinavir  
SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquis  
SIV : Simian Immunodeficiency Virus  
3TC : Lamivudine  
TAMs: Thymidine Analogue Mutations  
TDF : Tenofovir  
TME : transmission mère enfant  
Tat : protéine Trans activatrice  
TAR : traitement antirétroviral  
TPV : Tipranavir  
UCRC : University Clinical Research Center  
USTTB : université des sciences des techniques et de technologie de Bamako  
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

## **TABLEAU DES ILLUSTRATIONS**

Tableau I: Classification CDC selon le statut immunologique du patient (OMS, 1993). .....	11
Tableau II: liste des molécules ARV commercialisées(30).....	22
Tableau III: interprétations des résultats.....	44
Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour une réaction de RT/PCR du VIH1 ...	47
Tableau V: Composition du mélange réactionnel pour la réaction de Nested PCR pour.....	48
Tableau VI: Conditions d'amplification de la deuxième PCR pour le VIH-1.....	48
Tableau VII: Composition du mélange réactionnel pour une réaction de séquence du VIH-151	
Tableau VIII: Conditions d'amplification pour la réaction de séquence du VIH-1 .....	51
Tableau IX: Répartition des patients en fonction de l'âge.....	59
Tableau X : Répartition des patients en fonction du sexe :.....	60
Tableau XI: Répartition des patients en fonction des stades cliniques OMS à l'inclusion .....	60
Tableau XII: Répartition des patients en fonction du taux de Lymphocytes T CD4+ à l'inclusion .....	61
Tableau XIII: Répartition des patients en fonction du niveau de la charge virale au moment de l'échec virologique. ....	61
Tableau XIV: Répartition des patients en fonction de la durée du traitement ARV .....	62
Tableau XV: Répartition des patients en fonction du traitement ARV a l'initiation.....	62
Tableau XVI: Répartition des patients en fonction du schéma thérapeutique à l'échec .....	63
Tableau XVII: Répartition des patients en fonction de la résistance aux ARV.....	63
Tableau XVIII: Répartition des enfants résistants au TDF en fonction de l'âge.....	64
Tableau XIX: Répartition de la résistance aux ARV en fonction du sexe.....	64
Tableau XX: Répartition de la résistance aux ARV en fonction de la durée du traitement. ...	65
Tableau XXI: Répartition de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale à l'échec. ....	65

**FIGURE**

Figure 1:Structure morphologique du VIH(8) .....	7
Figure 2:Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1 .....	8
Figure 3: Cycle répliatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4+ .....	9
Figure 4 : La répartition géographique (ONUSIDA 2017).....	12
Figure 5 : Arbre phylogénétique des VIH.....	13
Figure 6 : Distribution géographique des VIH-1 dans le monde .....	16
Figure 7 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI.....	30
Figure 8 : Position des principales mutations de résistance aux IP .....	32
Figure 9: Schéma de la méthodologie du génotypage .....	55
Figure 10 : répartition de nos patients, en fonction des sous types du VIH-1. ....	66
Figure 11: Prévalence des mutations de résistance aux INTI. ....	67
Figure 12 : Les mutations de résistance associées aux INNTI .....	68
Figure 13: Mutations de Résistance aux IP.....	69

**Table des matières**

LISTE DES ABREVIATIONS.....	VI
TABLEAU DES ILLUSTRATIONS .....	IX
Table des matières.....	XI
1 Introduction.....	1
2 Objectifs.....	4
<b>2.1 Objectif général</b> .....	4
<b>2.2 Objectifs spécifiques</b> .....	4
3 Généralités .....	6
<b>3.1 Virus de l'Immunodéficience Humaine(VIH)</b> .....	6
<b>3.1.4 Stabilité physico-chimique</b> .....	8
<b>3.1.5 Cycle de réplication</b> .....	8
<b>3.1.6 Cellules cibles et réservoir du virus</b> .....	10
<b>3.1.7 Mode de transmission et Évolution naturelle de la maladie</b> .....	10
<b>3.2 Epidémiologie</b> .....	11
<b>3.3 Diversité génétique :</b> .....	12
<b>3.3.1 Mécanismes de la diversité génétique</b> .....	14
<b>3.3.2 Conséquences de la diversité génétique</b> .....	14
<b>3.4 Répartition géographique</b> .....	15
<b>3.5 Diagnostic biologique au laboratoire</b> .....	16
<b>3.5.1 Diagnostic indirect ou sérologique (18)</b> .....	16
<b>3.5.2 Diagnostic direct</b> .....	16
<b>3.5.3 Séquençage</b> .....	17
<b>3.6 Traitement :</b> .....	18
<b>3.6.1 Objectifs du traitement antirétroviral :</b> .....	18
<b>3.6.2 Obstacles :</b> .....	19
<b>3.6.3 Différentes classes thérapeutiques</b> .....	19
<b>3.6.4 Nouvelles molécules antirétrovirales</b> .....	22
<b>3.6.5 Stratégies de traitement antirétroviral :</b> .....	24
<b>3.6.6 Echec thérapeutique</b> .....	26
L'échec thérapeutique regroupe différentes situations. ....	26
<b>3.6.7 Observance</b> .....	27
<b>3.6.8 Résistance du VIH aux antirétroviraux :</b> .....	27

4	METHODOLOGIE : .....	37
4.1	Type et période d'étude : .....	37
4.2	Cadre et lieu d'étude : .....	37
4.2.1	SEREFO/UCRC : .....	37
4.2.2	Organisation du local de la charge virale : .....	38
4.3	Population d'étude .....	38
4.4	Critères d'inclusion : .....	38
4.5	Critères de non inclusion : .....	38
4.6	Techniques utilisées : .....	38
4.6.1	Technique Abbott HIV-1 Real Time TM: .....	39
4.6.2	Principe: .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.6.3	Procédure de la technique : .....	39
5	Résultats .....	59
6	Commentaire et discussion : .....	70
6.2	Technique utilisée : .....	70
6.3	Caractéristiques sociodémographiques et biologie : .....	70
6.4	Le traitement antirétroviral : .....	71
6.5	Diversité génétique et sous-type de VIH-1 : .....	71
6.6	La prévalence de la résistance au TDF : .....	71
6.7	Profil de résistance au TDF : .....	72
6.8	Prévalence de mutations de résistance aux INTI : .....	72
6.9	Prévalence de mutations de résistance aux INNTI : .....	72
6.10	Prévalence de mutations de résistance aux IP : .....	72
7	Conclusion et recommandations : .....	73
7.2	Conclusion : .....	73
7.3	Recommandations : .....	74
8	REFERENCES .....	75
	Annexe .....	76



# INTRODUCTION

## 1 Introduction

Depuis les années 1980 où les premiers cas d'infection au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ont été rapportés chez les homosexuels aux Etats Unis (USA) ; l'affection n'a cessé de se propager et de devenir une pandémie. Isolé à l'institut Pasteur de Paris par l'équipe de Luc Montagnier, le VIH responsable du syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) reste un problème majeur de santé publique dans le monde (1).

En 2020, l'ONUSIDA estimait dans son rapport que près de 37,7 millions de personnes vivaient avec le VIH-1. Concernant le continent africain, malgré une situation qui s'améliore de manière générale, de grandes inégalités demeurent en Afrique subsaharienne. Les femmes et les enfants y occupent toujours une grande partie des nouveaux cas d'infections. En effet, bien qu'à l'échelle mondiale, le pourcentage de femmes et de filles nouvellement infectées a été de 48%, en Afrique subsaharienne, il était de 59%. De même, 84% des nouveaux cas d'infection chez les enfants ont eu lieu en Afrique subsaharienne(2).

Depuis l'avènement de la trithérapie en 1996 des molécules antirétrovirales, telles que les inhibiteurs de la protéase, il y a eu une grande amélioration des traitements ARV (antirétroviraux). De nos jours, plus d'une vingtaine de molécules sont actuellement utilisées. Le traitement antirétroviral repose sur des molécules agissant à différents niveaux du cycle de réplication du virus. L'objectif est de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées au SIDA en ralentissant la prolifération du VIH à tel point que la charge virale plasmatique baisse en dessous des seuils de détection des automates d'analyse (50 copies /ml ou 20 copies/ml selon des appareils) afin de reconstituer les défenses immunitaires(3).

La combinaison actuelle de TARV consistait deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) (Tenofovir et Lamivudine) et un inhibiteur non nucléotidique de la transcriptase inverse (INNT) (Efavirenz) ou 2 INTI (Tenofovir et Lamivudine) + 1 IP (Lopinavir/Ritonavir).

Un manque de suivi biologique des patients en particulier ; un déficit majeur d'utilisation en routine des outils immunobiologiques 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. La sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations plasmatiques suboptimale d'antirétroviral consécutives à des difficultés d'observance ou à des interactions médicamenteuses), de la puissance du traitement antiviral et de la « barrière génétique » du

virus vis-à-vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre de mutations virales qui permet au virus d'être résistant(4).

La résistance aux antirétroviraux avant traitement augmente considérablement dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique subsaharienne, où elle dépasse largement le seuil de 10% qui constitue le seuil d'alerte pour l'OMS. La prévalence de la résistance chez les enfants avec une charge virale détectable malgré un TAR est de 80% et 20% chez les nourrissons infectés par le VIH. La fréquence de la résistance augmente en fonction du nombre de traitement auquel a été exposé l'enfant(5). Ces résistances peuvent être acquises ou transmises et elles apparaissent en particulier chez les personnes infectées qui ont eu une exposition préalable aux antirétroviraux, en cas d'interruption ou de traitement de prévention (transmission mère-enfant)(6).

L'accès aux antirétroviraux (ARV) pour le traitement des enfants infectés par le VIH dans ces pays s'est beaucoup amélioré. Alors que de plus en plus d'enfants sont mis sous traitement ARV, de nouveaux défis se présentent notamment l'efficacité des traitements et le risque d'échec aux traitements ARV dû soit à une mauvaise observance, ou à une concentration sérique insuffisante des médicaments et/ ou la préexistence de la résistance aux molécules à cause d'une exposition maternelle à ces molécules. Très peu de données sont disponibles sur le profil de résistance en cas d'échec virologique chez les enfants infectés par le VIH pourtant essentiel pour le choix adéquat des molécules. Notre étude porte sur le profil de résistance induit par l'exposition aux ARV et l'incidence des mutations de résistance.

# **OBJECTIFS**

## **2 Objectifs**

### **2.1 Objectif général**

Étudier la résistance aux traitements antirétroviraux du VIH-1 chez les enfants et adolescents en Afrique de l'Ouest.

### **2.2 Objectifs spécifiques**

- Décrire les caractéristiques sociodémographiques des enfants et adolescents ;
- Déterminer la prévalence de la résistance aux ARV chez les enfants et adolescents ;
- Déterminer le profil de résistance du Ténofovir chez les enfants et adolescents ;
- Décrire la diversité génétique des sous-types du VIH-1 circulant chez les enfants et adolescents.

# **GENERALITES**

### 3 Généralités

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

##### 3.1.1 Historique de la découverte du VIH/SIDA :

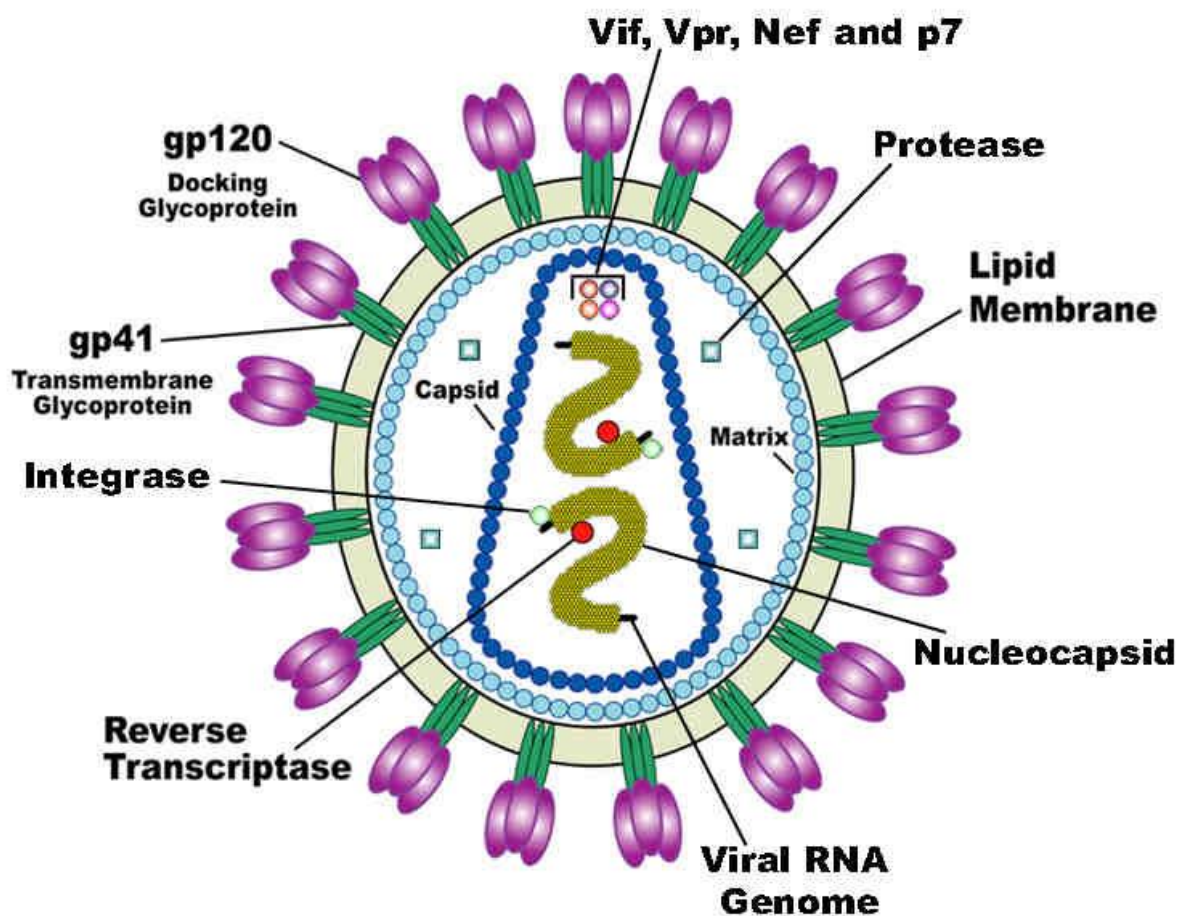
C'est en 1981 que M. Gottlieb, à Los Angeles, est amené à observer une pneumonie à "*Pneumocystis carinii*" chez un sujet masculin jeune sans antécédents médicaux notables. La Pneumocystose était alors une maladie exceptionnelle rencontrée chez les grands Immunodéprimés iatrogéniques. Ce patient présentait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

de SIDA va alors être retenu pour cette infection (1).

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

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine responsable du syndrome d'Immunodéficience Acquis appartient à la famille des *Retroviridae*, Virus à **ARN** monocaténaire, à capsid polyédrique, à enveloppe membranaire, les rétrovirus ont en commun le fait que leur génome doit être transcrit en ADN par une ADN polymérase ARN dépendante (synthétisant l'ADN sur une matrice qui est l'ARN génomique), autrement dit une transcriptase inverse (TI ou RT pour *reverse transcriptase* en anglais)(7).

### 3.1.3 Structure et morphologie du VIH



**Figure 1: Structure morphologique du VIH(8)**

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui contient à sa surface une protéine de fusion ainsi qu'une molécule servant à lier les récepteurs de la cellule cible. C'est sous la bicouche lipidique que se trouve la MA qui elle-même protège la CA de forme conique. Cette dernière protège à son tour la NC, les deux copies du génome viral ainsi que la protéase, la TI et l'IN. Le diamètre de la particule virale varie de 90 à 120 nm.



## Organisation génomique du VIH-1

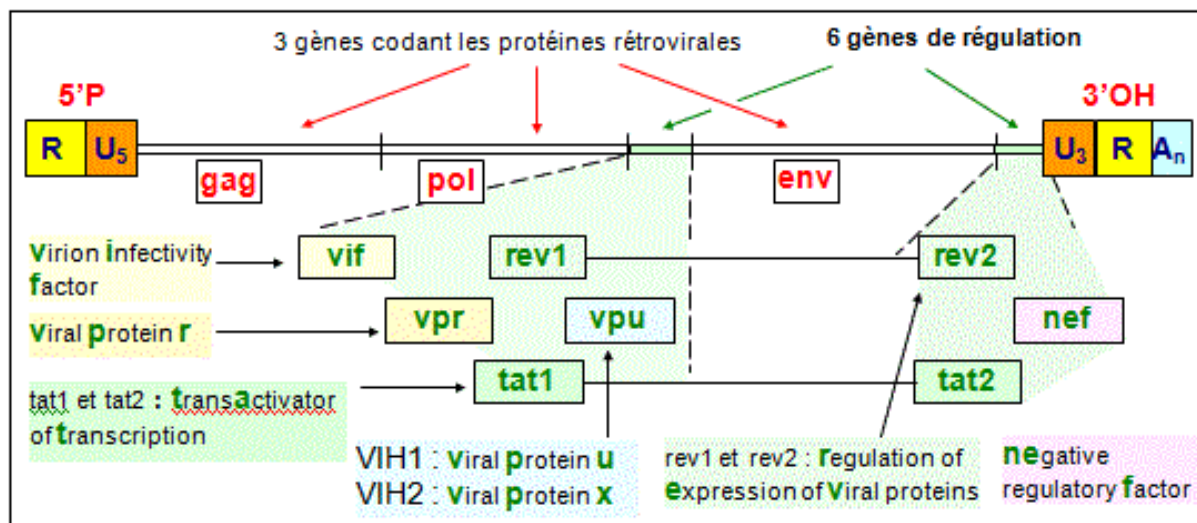


Figure 2: Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1

Le 33génome du VIH-1 est présent en deux copies d'ARN identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux, gag, Pol, env. qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. Le gène gag mène à la production du précurseur Gag (Pr55) qui, suite à son clivage, produit la matrice (MA) (p17), la capsid (CA) (p24), la nucléocapsid (NC) (p7) et une petite protéine p6. Ces protéines structurales sont essentielles pour obtenir une particule virale complète. De son côté, le gène Pol code pour les enzymes telles que la transcriptase inverse (TI) (rétro transcription (RT) de l'ARN en ADN), l'intégrase (IN) (intégration de l'ADN viral au génome cellulaire) et la protéase (maturation des particules virales).

Enfin, le gène env. permet la production des protéines qui constituent l'enveloppe soit la glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41(9).

### 3.1.4 Stabilité physico-chimique

Le VIH étant un virus enveloppé, il est sensible aux solvants des lipides et aux détergents. Il ne résiste pas à la chaleur puisqu'il est inactivé à 56°C pendant 30 minutes et également par traitement pendant 5 minutes à l'hypochlorite de sodium à 0,2%, l'éthanol à 70 %, le glutaraldéhyde à 0,2 % (10).

### 3.1.5 Cycle de réplication

Les cellules cibles du VIH sont celles présentant des récepteurs CD4 à leur surface. Ainsi les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules micro gliales cérébrales peuvent être infectées par le VIH. La réplication virale a lieu dans plusieurs tissus.

**La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes :** Le virus entre en contact avec le récepteur CD4 via sa glycoprotéine gp120, qui va subir certaines modifications lui permettant de se fixer à un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). Cette fixation dévoile la gp41, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Il y a peu de temps, il était acquis, que la transcription inverse de l'ARN viral n'avait lieu qu'après la décapsidation. Or, de récentes études ont montré que cette étape pouvait avoir lieu également dans la capside, présente dans le cytoplasme(11). L'ARN génomique y est ainsi rétro-transcrit en ADN par la TI. L'ADN migre ensuite dans le noyau sous forme de complexe de pré-intégration pour être intégré dans le génome de la cellule hôte sous forme proviral grâce à l'intégrase. L'ADN proviral reste ensuite soit à l'état latent, soit est transcrit en ARN par la machinerie cellulaire. Les ARN produits sont destinés à plusieurs étapes : certains serviront de matériel génétique pour les nouveaux virions, d'autres seront traduits en poly protéines, en ayant subi une étape d'épissage au préalable ou non. Les poly protéines produites vont subir certaines modifications ; la gp160 est clivée par une protéase cellulaire en gp120 et gp41, protéines qui vont ensuite migrer vers la membrane cellulaire. Les précurseurs gags et gag-pol vont ensuite être clivés par la protéase virale, qui se sera auto-clivée de gag-pol au préalable. Tous ces éléments vont ensuite se rapprocher de la membrane cellulaire pour être empaquetés. Le virion ainsi formé, après bourgeonnement, entre dans un processus de maturation grâce à la protéase pour aboutir à un virus mature dont la capside est défensivement assemblée(12).

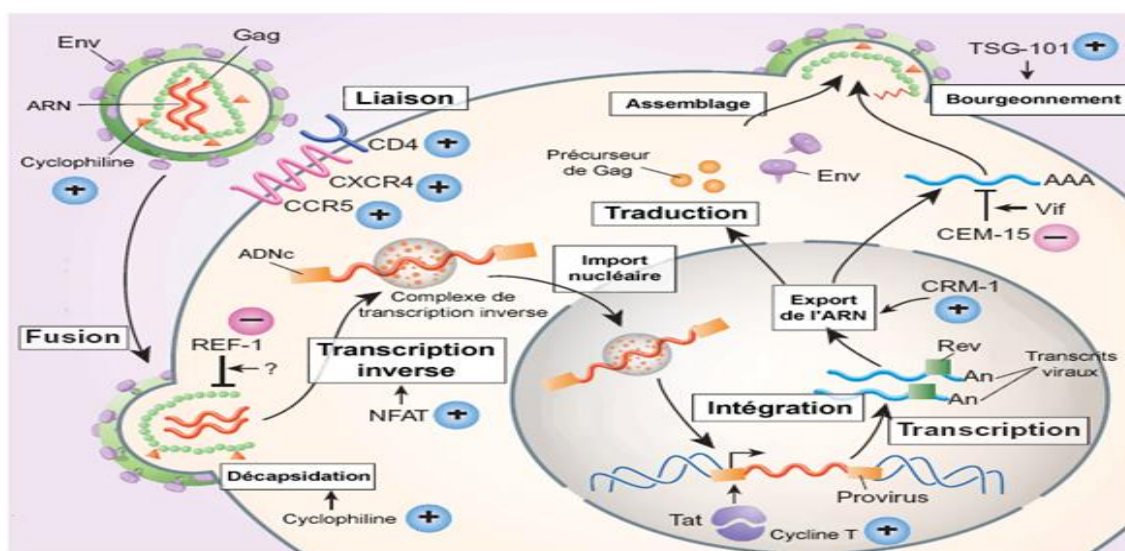


Figure 3: Cycle réplcatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4+

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

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

### **3.1.7 Mode de transmission et Évolution naturelle de la maladie**

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

Le virus est présent dans les liquides biologiques de l'organisme des personnes Infectées. On le retrouve donc dans : le sang, le sperme, le liquide séminal, les sécrétions anales, les sécrétions vaginales et le lait maternel. Les trois principaux modes de transmission sont donc : la transmission par voie sexuelle, la Transmission par voie sanguine et la transmission verticale (mère/enfant) (13).

### 3.1.7.2 Évolution naturelle de la maladie

Évolution de l'infection virale selon CDC dans le tableau ci-dessous (7)

**Tableau I: Classification CDC selon le statut immunologique du patient (OMS, 1993).**

selon CDC (centres for disease control) modifiée en 1993 Lymphocytes TCD4+	Catégorie clinique		
	(A) ou stade 1 OMS Asymptomatique Primo-infection Lymphadénopathie généralisée persistante	(B) ou stade 2/3 OMS Symptomatique sans critères (A) ou (C)	(C) ou stade 4 OMS Sida
> 500/mm <sup>3</sup>	A1	B1	C1
200-499/mm <sup>3</sup>	A2	B2	C2
< 200/mm <sup>3</sup>	A3	B3	C3

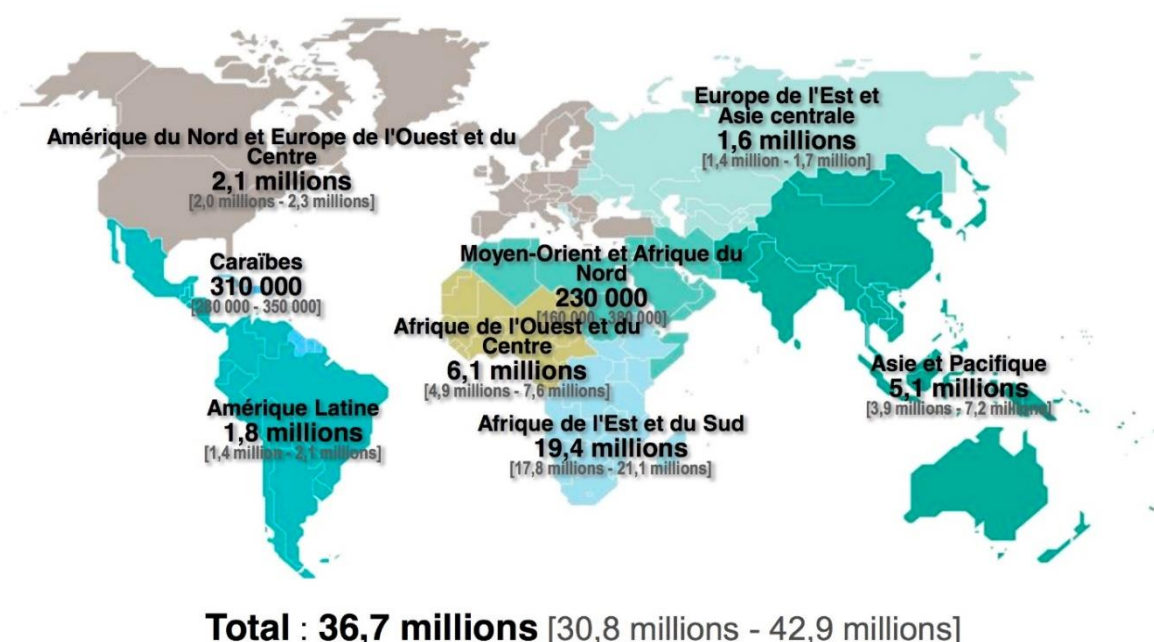
Il n'y a pas eu une harmonisation de la définition du SIDA, ainsi la définition du SIDA aux Etats-Unis correspond aux C\* et en France, elle se justifie par un nombre de CD4 inférieur à 200/mm<sup>3</sup>.

### 3.2 Epidémiologie

Bien que le sida demeure l'un des défis de santé les plus importants du monde, la solidarité Internationale qui s'est mise en place au cours de la dernière décennie pour lutter contre ce fléau continue de générer d'extraordinaires progrès. Combinée à l'émergence de nouveaux outils efficaces conçus pour prévenir les nouvelles infections et les décès liés au sida, la réussite spectaculaire de l'élargissement et de l'intensification des programmes liés au VIH a permis de jeter les bases de l'éradication définitive de cette maladie. À l'échelle mondiale, 37.7 millions [32.7 – 44.0millions] de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2020(rapport de l'ONUSIDA 2020). Selon les estimations, 1,7 millions d'enfants (<15 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. Bien qu'il y ait eu des avancées en matière de couverture de la thérapie antirétrovirale pour les enfants en Afrique de l'Ouest et du Centre, qui est passée de 26% en 2017 à 35% en 2020, la région a toujours la

couverture la plus faible du monde .Environ 52000 enfants et adolescents entre 0 et 15 ans sont décédés de maladies liées au sida en 2020(2).

Au Mali, les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2012 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographique et de Santé (EDS M-V), ont montré une baisse du taux de prévalence du sida de 1,3% à 1,1% faisant du Mali un pays à faible prévalence. Globalement, les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,3%et 0,8%). Le pic de séroprévalence se situe, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, dans la tranche d'âge 30-34 ans (2,2%), témoignage d'une épidémie bien installée. (EDSM V, 2013)(14).



**Figure 4 : La répartition géographique (ONUSIDA 20217)**

### **3.3 Diversité génétique :**

Celle-ci tient au processus même de multiplication de ces virus qui sont obligés de transformer leur ARN génomique en ADN pour s'intégrer dans la cellule hôte. Dès 1985, une variabilité génétique importante des VIH a été mise en évidence ; il n'existe pas deux virus identiques, même au sein d'un même individu. Cette diversité génétique, due à différents mécanismes (faible fiabilité de la TI, haut niveau de réplication, recombinaison génétique) peut avoir des conséquences sur la réponse aux traitements antirétroviraux. Le VIH est divisé en deux "groupes", VIH-1 et VIH-2 qui proviennent de 2 événements de transmission inter-

espèces différents, issus respectivement du Chimpanzé et du Southey Mangabey. Les analyses phylogénétiques du VIH-1 à partir de différents isolats ont permis de le classifier en 4 groupes génétiques M(main), O (Outlier), N (non-M, non-O) et le dernier groupe P découvert récemment par l'équipe de Plantier. La majorité des infections par le VIH est causée par le groupe M, les infections par les groupes N et O étant restreintes à l'Afrique centrale. Dans le groupe M, 9 sous-types sont reconnus et désignés par les lettres A-D, F-H, J et K, les variations génétiques entre les sous-types allant de 25 à 35% selon les sous-types et les régions du génome considérés. Il existe également des variations au sein d'un sous-type, entre 15 et 20%, tels que le sous-type F, divisé en sous sous-types F1 et F2 et le sous-type A en A1, A2 et A3. Les analyses de tout le génome ont révélé l'existence de virus recombinants inter sous types issus de patients surinfectés ou Co-infectés. Ces virus recombinants sont appelés CRFs (Circulating Recombinant Forms) lorsqu'ils ont été identifiés chez au moins 3 individus non liés épidémiologiquement et caractérisés sur tout le génome. Dans le cas contraire, ils sont appelés URFs (Unique Recombinant Forms), plus de 200 actuellement [15]. A ce jour 51 CRFs ont été identifiés, les recombinants CRF01\_AE et CRF02\_AG jouant un rôle important dans les épidémies régionales (15).

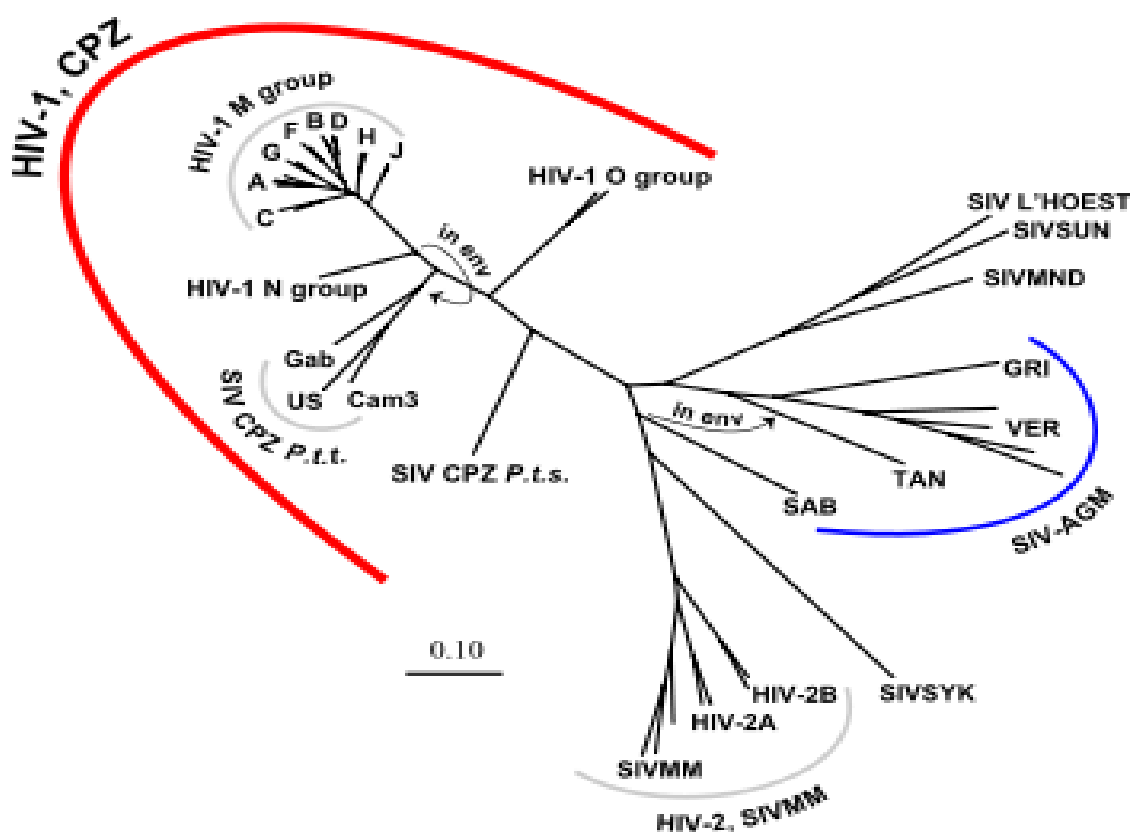


Figure 5 : Arbre phylogénétique des VIH



### **3.3.1 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 individus infectés) 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 [14].

### **3.3.2 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 diagnostic (sérologique, charge virale) et notamment sur la réponse au traitement antirétroviral. Les tests de dépistage, reposant sur des antigènes du VIH-1 du sous-type B prévalent en occident et qui peuvent avoir une sensibilité moindre vis-à-vis des autres sous types de groupe M appelé non B.

- Certaines études laissent entendre que la résistance aux ARV varierait selon les sous-types : par exemple, le groupe O du VIH-1 pourrait présenter une sensibilité moindre aux INNTI.

- Ainsi des études ont montré que plus de 50% des virus non B infectant des patients naïfs portent au moins trois mutations mineures de résistances aux IP, alors qu'elle n'est que 8% pour le B[15] La question de la sensibilité aux ARV, et particulièrement aux inhibiteurs de protéase des souches présentant un grand polymorphisme génétique reste posée.

- La diversité génétique du VIH constitue un obstacle à la mise au point de vaccins efficaces. En effet, la majorité des candidats vaccins, faisant actuellement l'objet d'essais cliniques ont été créés au moyen de souches de VIH-1 de sous-type B (prédominant en Amérique du Nord et en Europe).

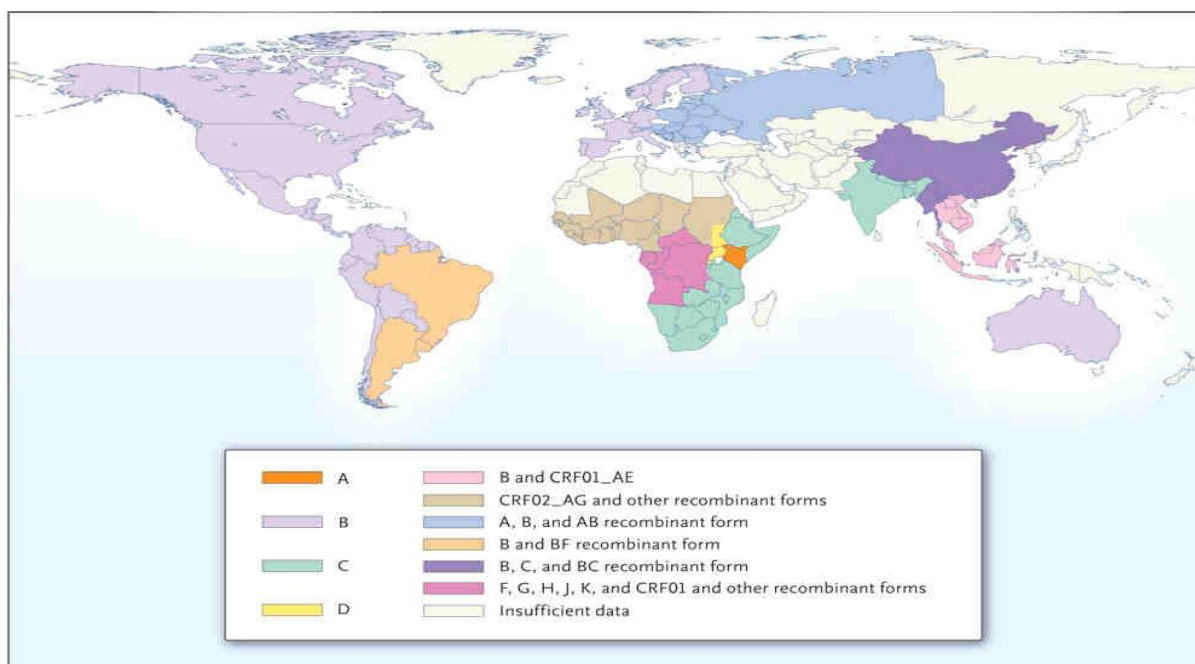
Cependant, on ignore jusqu'à quel point ces vaccins pourraient conférer une protection Croisée entre les autres sous-types, notamment ceux prédominant en Afrique. La recombinaison entre différents types et sous-types peut induire des conséquences génétiques et biologiques de loin plus importantes que celle résultant de l'accumulation stable d'une simple mutation au sein d'un type ou d'un sous-type unique.

La sélection des mutations à l'échec, les profils d'échappement peuvent également être différent selon le sous type de VIH-1. En effet, certaines mutations spécifiques aux sous-types peuvent être sélectionnées lors du traitement, par exemple le sous-type C, qui présente de nombreuses spécificités(16)

### **3.4 Répartition géographique**

Le VIH est très répandu au niveau mondial, les VIH-1 de sous types non-B représentent au moins 90% des virus circulants. Les sous types prédominants sont le sous type C, responsable de 50 % des infections, principalement en Afrique de l'Est, en Asie, le sous type A et le D en Afrique de l'Est, le sous type CRF02\_AG en Afrique de l'ouest et le sous type B aux Etats Unis, en Europe et en Australie. 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 très grande majorité des infections à VIH-1 groupe O est retrouvée en Afrique de l'Ouest et, plus particulièrement, au Cameroun où différentes études montrent la présence de 3,4 % de patients infectés par le virus de groupe O, soit une prévalence de 0,5 % dans la population générale. Des études récentes ont démontré qu'en France, des sous types non-B circulent, et que la moitié de ces virus isolés sont des virus CRF02\_AG, ce qui témoigne des liens existant entre la France et l'Afrique de l'Ouest. Le VIH-2 a une diffusion beaucoup plus limitée, et est essentiellement présent en Afrique de l'Ouest, en particulier en Guinée-Bissau, Gambie, Sénégal, Côte d'ivoire, Burkina Faso, Mali. Il a atteint le Mozambique et l'Angola, à partir de la Guinée-Bissau et hors d'Afrique la France, l'Inde, le Portugal et le Brésil (17).





**Figure 6 : 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.

### 3.5 Diagnostic biologique au laboratoire

Le diagnostic d'infection transmise chez l'enfant né de mère séropositive au VIH est actuellement posé avant l'âge de 6 mois par les techniques de diagnostic direct. Le diagnostic indirect ou sérologique, permet d'apporter la confirmation définitive de non-infection. Tout nouveau-né de mère séropositive au VIH est « séropositif au VIH » à la naissance, qu'il soit ou non infecté. Cela est dû au transfert passif des anticorps maternels de type IgG à travers la barrière placentaire. De fait, la sérologie reste positive jusqu'à la disparition des anticorps maternels (environ 18 - 24 mois) quel que soit le statut de l'enfant. Le diagnostic d'infection transmise le plus précoce possible repose sur la mise en évidence directe du virus ou de son génome dans l'organisme de l'enfant.

#### 3.5.1 Diagnostic indirect ou sérologique (18)

Il se fait en deux étapes avec un test de dépistage ELISA réalisé au moyen de deux techniques différentes qui doivent être utilisées en parallèle. Si l'un des tests ELISA est positif, il sera confirmé par un test de Western-Blot (WB).

#### 3.5.2 Diagnostic direct

Il repose sur plusieurs techniques toutes réalisées à partir d'un simple prélèvement sanguin qu'il convient de répéter. La PCR-RNA plasmatique met en évidence le génome du virus dans le plasma par RT-PCR. C'est la « charge virale », réalisée également dans le suivi des

adultes infectés. Le DNA Proviral recherche le provirus intégré dans les cellules mononuclées réceptives (CD4 essentiellement). A Nice, le laboratoire de virologie effectue, sur le même prélèvement, une PCR-RNA plasmatique et une recherche quantitative de DNA proviral (par PCR quantitative en temps réel). La conjugaison des deux techniques augmente la sensibilité(19).

### **Chez les enfants de moins de 18 mois**

Le diagnostic d'infection est établi chez tous les nouveau-nés de mère séropositive sur la base de 2 tests PCR positifs réalisés sur 2 échantillons différents, à partir de la naissance jusqu'à 6 semaines d'âge. Chez les enfants sous allaitement maternel, le deuxième test devra être réalisé deux mois après l'arrêt de l'allaitement.

Les tests recommandés sont le test ADN du VIH sur échantillon de sang total ou sur gouttes de sang desséché (DBS) ou le test ARN du VIH dans le plasma ou sur gouttes de sang desséché.

Les tests de diagnostic précoce peuvent être réalisés au laboratoire ou dans la salle de consultation avec les Point Of Care (POC)(20)

### **3.5.3 Séquençage**

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

- Principe :

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977(prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés désoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérase 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'[30]. 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(21).

#### **3.5.3.2 Les outils bio-informatiques d'analyse des séquences de l'ADN :**

##### **3.5.3.2.1 Objet de la bio-informatique :**

La bio-informatique 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(22).

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

L'analyse bio-informatique 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.

## **3.6 Traitement :**

Les antirétroviraux sont des molécules virostatiques de synthèses de différentes natures chimiques regroupées en trois grandes classes selon leur mode d'action : les INTI, les INNTI et les IP. Une quatrième classe d'inhibiteurs de la fusion est actuellement en cours de développement. En 1996 arrive le concept de trithérapie, avec la disponibilité de nouvelles molécules antirétrovirales telles que les inhibiteurs de la protéase, montrant une réduction significative de la mortalité liée au SIDA. En effet, l'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes T CD4+ ; il doit rendre la charge virale plasmatique indétectable permettant une meilleure restauration du système immunitaire [4].

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

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

- L'amélioration ou la préservation de la qualité de vie ;
- La réduction de la transmission mère-enfant du VIH.

### **3.6.2 Obstacles :**

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

- une minorité de patients infectés par le VIH dans le monde entier a accès aux antirétroviraux. En Afrique subsaharienne, 73% des personnes ayant besoin d'ARV en bénéficient réellement [2]. 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

- L'observance chez l'enfant pose des difficultés particulières. Elle peut être influencée par de nombreux facteurs : le choix limite des formulations pédiatriques ; le mauvais goût des formulations liquides ; le grand nombre de comprimés ou la grande quantité de sirop à prendre ; la grosseur des comprimés ; la nécessité de prises médicamenteuses fréquentes ; les restrictions alimentaires ; la perte de la personne principale s'occupant de l'enfant ; les difficultés à avaler les comprimés ; et les effets indésirables. Pour que le traitement d'un enfant soit un succès, une personne qui s'occupe de lui doit être pleinement engagée et impliquée. Les parents et les autres membres de la famille des enfants vivant avec le VIH peuvent eux-mêmes être infectés ; des soins et un traitement sous-optimaux des membres de la famille peuvent donc se traduire par des soins sous-optimaux de l'enfant.

### **3.6.3 Différentes classes thérapeutiques**

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

#### **✓ Les inhibiteurs de la transcriptase inverse**

##### **-Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (INTI)**

Les INTI (ou NRTI pour nucléoside reverse transcriptase inhibitor) sont des pros médicaments qui doivent être triphosphorylés dans la cellule pour être actifs. Ils subissent une activation en nucléoside triphosphate par les kinases cellulaires. Les formes triphosphates (et di phosphate pour le Ténofovir) possèdent une forte affinité pour la transcriptase inverse du virus VIH-1 et entrent en compétition avec les désoxynucléosides triphosphates naturels. Ils sont donc incorporés préférentiellement dans la chaîne de l'ADN en croissance causant une

terminaison précoce de celle-ci (en raison du manque 3'-hydroxyl pour former le lien phosphodiester entre nucléotides). Le groupe OH 3' libre est nécessaire pour former une liaison avec le prochain nucléotide de la chaîne nucléotide en formation. Une fois phosphorylée, ces analogues rompent la transcriptase inverse en la faisant incorporer dans la chaîne de nucléotides en formation où ils servent de terminateur de chaîne(23).

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

Ces sont des composés de structure chimique complètement différentes de celles des nucléosides normaux. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs allostériques. Les INNTI occupent une poche hydrophobe voisine du site ADN-polymérase. Leur complexation modifie la géométrie de l'enzyme, ce qui diminue considérablement son efficacité catalytique. Cela provoque un changement de conformation du site actif en déplaçant les résidus d'aspartate catalytiques (en relation avec le site de liaison) de la polymérase de telle façon qu'il ne peut plus se lier à un substrat nucléotide, rendant ainsi l'enzyme inactif. Contrairement aux INTI, les INNTI n'ont pas besoin d'une activation cellulaire puisqu'ils n'ont pas besoin de phosphorylation pour être actifs.

Par conséquent, ces molécules ont un potentiel plus élevé que les INTI et inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 de façon irréversible mais pas celle du VIH-1 de groupe O et du VIH-2(24).

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

Les inhibiteurs de la protéase (IP ou PI pour protéase inhibitor) bloquent la phase tardive de la maturation virale. La protéase du VIH clive les polypeptides précurseurs, produits des gènes *gag* et *pol* codant les protéines de structure et les enzymes du virion. Les virions produits sous IP sont immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules. Métabolisés par le cytochrome P450, les IP sont l'objet d'interactions avec d'autres médicaments utilisant les mêmes voies métaboliques. Certains de ces autres médicaments sont contre indiqués avec les IP, d'autres imposent des ajustements de doses. Les associations de deux IP et d'INNTI peuvent également nécessiter de tels ajustements. L'utilisation des IP est associée, à des degrés divers à une redistribution des graisses, à des troubles de la glycorégulation et à des hyperlipidémies(25).

✓ **Les inhibiteurs d'entrée**

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

### **-Les inhibiteurs d'attachement**

Après la fixation du VIH sur le récepteur CD4, des interactions ont lieu entre le virus et des corécepteurs protéiques, faisant partie de la famille de chimio kinés, en particulier le CCR5 et le CXCR4(26).

Les antagonistes du CCR5 (Maraviroc®) sont de petites molécules qui se fixent de façon non compétitives sur la partie transmembranaire du corécepteur et induisent alors une modification des domaines extracellulaires du corécepteur qui empêche la fixation de la gp120(27)

### **-Les inhibiteurs de fusion**

Le seul inhibiteur de fusion actuellement disponible est un polypeptide, devant donc être injecté, dont la séquence correspond à une région de la gp41 (HR2, heptadrepeat région). Il se lie de façon spécifique à l'ecto domaine (domaine HR1) de la protéine gp41, au moment où celle-ci est découverte par la liaison de gp120 au récepteur CD4 et aux récepteurs des chimio kinés.

Les inhibiteurs de fusion empêchent le changement de conformation de gp41 qui mènerait à la fusion des membranes du virus et de la cellule-hôte. En fait, ils seraient liés à la gp41 sous sa conformation de « repos » et l'empêcherait ainsi d'adopter une conformation en épingle à cheveux favorable à la fusion (28)

### **✓ Les inhibiteurs de l'intégrase**

L'intégrase est une enzyme nécessaire à la catalyse de l'étape d'insertion et de transfert de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Cette étape d'intégration est fondamentale pour le maintien et la stabilité du génome viral, ainsi que pour une expression optimale des gènes viraux. Les inhibiteurs de l'intégrase constituent une nouvelle classe d'agents antirétroviraux qui bloquent l'activité de l'intégrase du VIH-1(29)

Les inhibiteurs de l'intégrase sont actifs sur les virus résistants aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), aux inhibiteurs de la protéase (IP) et aux inhibiteurs d'entrée. Les inhibiteurs d'intégrase disponibles ou en développement empêchent le transfert de brins. L'ADN non intégré est ensuite dégradé.

### 3.6.4 Nouvelles molécules antirétrovirales

**Tableau II: liste des molécules ARV commercialisées(30)**

<b>Dénomination commune Internationale (DCI)</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Nom commercial</b>	<b>Autorisation de mise sur le marché</b>
<b>Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse</b>			
<b>Zidovudine</b>	AZT	Retrovir ®	1987
<b>Lamivudine</b>	3TC	Epivir®	1996
<b>Stavudine</b>	d4T	Zerit®	1996
<b>Didanosine</b>	ddI	Videx®	1992
<b>Abacavir</b>	ABC	Ziagen®	1999
<b>Emtricitabine</b>	FTC	Emtriva®	2003
<b>Tenofovir</b>	<b>TDF</b>	<b>Viread®</b>	2002
<b>Inhibiteurs non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse</b>			
<b>Nevirapine</b>	NVP	Viramune®	1998
<b>Efavireuz</b>	EFV	Sustiva®	1999
<b>Etravirine</b>	ETR	Entelence®	2008
<b>Inhibiteurs de la protéase</b>			
<b>Indinavir</b>	IDV	Crixivan®	1996
<b>Ritonavir</b>	RTV	Norvir®	1996
<b>Saquinavir</b>	SQV	Invirase®	1996

Nelfinavir	NFV	Viracept®	1998
Fosamprénavir	Fos APV	Telzir®	2004
Atazanavir	ATV	Reyataz®	2004
Lopinavir / ritonavir	LPV/ r	Kaletra®	2001
Tipranavir	TPV	Aptivus®	2005
Darunavir	DRV	Prezista®	2008
<b>Inhibiteurs d'entrée</b>			
Enfuvirtide	T20	Fuzeon®	2003
Maraviroc	MRV	Celsentri®	2008
<b>Inhibiteurs d'intégrase</b>			
Raltégravir	RAL	Isentress®	2008
Dolutégravir	DTG		2016

La CROI 2011 (Conférence sur les Rétrovirus et les Infections Opportunistes 2011) à Boston (USA) du 27 Février au 2 Mars a permis de faire le point sur *la* Rilpivirine, un non nucléosidiques de deuxième génération, *le* Dolutégravir, une anti-intégrase, et le BMS-068, un inhibiteur d'attachement, ce dernier était pendant l'actualité de la CROI 2014 à Boston, Etats-Unis, 3-6 mars 2014.

Tant chez les patients naïfs que chez les patients expérimentés, les essais ont démontré que le Raltégravir est très efficace. Une des spécificités de son activité est une efficacité antivirale rapide en quelques semaines par rapport aux thérapies classiques(31).

Le Dolutégravir est un nouvel inhibiteur de l'intégrase, a été lancé récemment. Il présente certains avantages par rapport aux autres inhibiteurs de l'intégrase, notamment une administration une fois par jour sans exigence alimentaire ni besoin de rappel pharmacologique, avec un faible potentiel d'interactions médicamenteuses et une barrière



génétique plus élevée contre la résistance au VIH. Il a prouvé son efficacité chez les patients naïfs de traitement ainsi que chez les patients prétraités, avec une excellente tolérance clinique et biologique(29)

### **3.6.5 Stratégies de traitement antirétroviral :**

En l'absence de vaccin anti-VIH, le traitement antirétroviral comme outil de prévention de la transmission est une évolution majeure, avec plusieurs études qui démontrent le rôle bénéfique des ARV non plus seulement au niveau de la santé de l'individu mais aussi dans la réduction drastique de la contagiosité lorsque la charge virale plasmatique est contrôlée sous traitement. En octobre 2015, l'OMS a publié des directives sur ce qu'il appelle l'approche du tout-en-un –recommandant la thérapie antirétroviral(TAR), pour toutes les personnes vivant avec le VIH, quel que soit le nombre de cellule CD4. Communément appelée test and treat, cette approche met les patients sous TAR immédiatement après un diagnostic de séropositivité dans le but d'améliorer les résultats de santé. Les preuves d'études montrent que plus les patients commencent tôt le TAR, mieux ils se portent(32)

#### **Schémas thérapeutiques**

Le schéma thérapeutique préconisée par l'OMS en première intention est l'utilisation de (02) INTI+ (01) IP/r (/r = boosté par le ritonavir) ou (2) INTI + (01) INNTI ou (2) INTI + (1) INI avec usage de molécules moins toxiques et de combinaisons de thérapie antirétrovirale de dose fixe(33)

Les régimes préférentiels en première intention ou schéma de 1ère ligne et en deuxième intention ou de 2ème ligne chez les nourrissons et les enfants sont les suivants :

#### **1. Enfants âgés de 3ans à 10 ans et les adolescents de moins de 35 Kg**

L'option thérapeutique préférée en première ligne est une trithérapie associant deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI).

**Le schéma préférentiel en première ligne:**

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

**Les régimes alternatifs suivants sont possibles:**

Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)

Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)

Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)

Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)

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

**2. Enfants de moins de 3 ans**

**Le régime préférentiel** est une trithérapie comprenant : 2 INTI + 1IP

Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Kaletra (LPV/r)

**Le régime alternatif** sera 2 INTI +1 INNTI :

Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP)

Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP)

En cas de contre-indication ou de toxicité à une molécule du schéma préférentiel de première ligne, on substituera la molécule incriminée par une autre molécule.

**Schémas préférentiels de deuxième ligne**

Comme chez l'adulte, le traitement repose sur l'association de 2 inhibiteurs nucléosidiques et d'un inhibiteur de la protéase «boosté» par le Ritonavir.

Le régime : **Abacavir (ABC) + didanosine (DDI) + Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)**

Le Nelfinavir (NFV) peut être utilisé en cas d'intolérance au Lopinavir/Ritonavir ou si la chaîne du froid n'est pas assurée (thermolabilité du Ritonavir)

**Schémas possibles de 3ème ligne chez les enfants**

Les patients en échec virologique de 2ème 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<sup>ère</sup> année de vie quel que 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, quel que 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  $\leq$  750 cellules/mm<sup>3</sup>, celui le plus bas quel que 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  $\leq$  350 cellules/mm<sup>3</sup> (comme chez l'adulte) quel que soit le stade clinique OMS.

- Initier le traitement ARV pour tous les enfants infectés avec un stade clinique 3 et 4 quel que 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 (34).

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.

### **3.6.6 Echec thérapeutique**

L'échec thérapeutique regroupe différentes situations.

#### **3.6.6.1 Echec virologique**

L'échec 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-dessus du seuil de détection. Actuellement, un seuil à 50 copies/ml est le plus souvent utilisé et constitue l'objectif à atteindre pour toute intervention thérapeutique quelle que soit la situation thérapeutique: traitement initial ou traitements de ligne ultérieure (35). En Afrique subsaharienne, l'échec virologique est défini comme étant l'impossibilité de réduire la charge virale à un niveau indétectable après six mois de traitement bien conduit. Il est caractérisé par une charge virale plasmatique supérieure à 1000 copies/ml après

vérification de l'observance [3]. Il faut différencier l'échec virologique du « rebond virologique » qui est défini comme une charge virale détectable après une période d'indétectabilité (au moins 2 points consécutifs) ; ce dernier aussi doit être distingué d'un « blip » de la charge virale (détection d'une charge virale plasmatique isolée comprise entre 50 et 1000 copies/ml sur un prélèvement avec un point suivant de charge virale, réalisé au plus tard un mois après, < 50 copies/ml) (36).

### **3.6.6.2 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 pré thérapeutique bas, un âge plus avancé. Cet échec peut s'accompagner d'un succès ou d'un échec virologique (37).

### **3.6.6.3 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.

### **3.6.7 Observance**

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

### **3.6.8 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 (38)

#### **3.6.8.1 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 (39)

### **3.6.8.2 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(40).

Ces mécanismes peuvent être dus à la dynamique de production virale très rapide, il a été calculé qu'environ 10 milliards de virions étaient produits chaque jour chez une personne infectée à la variabilité génétique importante du VIH,

La TI fait une erreur par cycle de réplication (1 erreur tous les 10 000 nucléotides), d'où l'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 variantes viraux à la préexistence, avant tout traitement, de variantes viraux présentant des mutations de résistance aux ARV, qui peuvent s'accumuler.

### **3.6.8.3 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.

### **3.6.8.4 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 TAMs. En effet, ces dernières empêchent la sélection de la mutation K65R.

Le complexe MDR (Mutation Drug Résistance), relevant de ce même mécanisme, est composé des mutations A62V, V75I, F77L, F116Y et Q151M.

Un autre profil de résistance à l'ensemble des analogues nucléosidiques et au ténofovir consiste en des insertions au codon 69 de la transcriptase inverse. Ce complexe comprend une mutation au codon 69, typiquement une sérine, et une insertion d'acides aminés (S-S, SA, S-G ou autre). Ces insertions au codon 69 sont souvent associées à d'autres mutations sur le gène de la transcriptase inverse. La fréquence de ces insertions est heureusement rare(41).

#### **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 TAMs pour Thymidine Analogue Mutations(42) .

L'accumulation des TAMs est graduelle et l'ordre d'apparition peut varier. Les profils de TAMs 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.

En effet, les TAMs 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 TAMs (39).

Les TAMs 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 Tenofovir ni la didanosine.

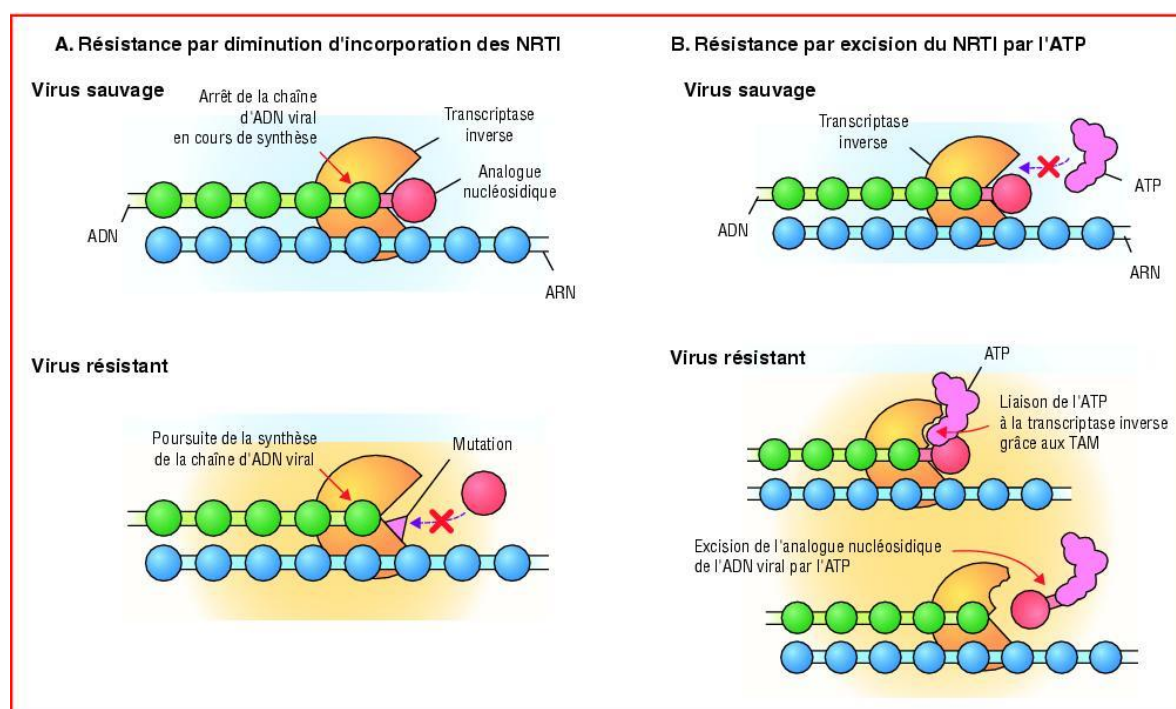


Figure 7 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI

### 3.6.8.5 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

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

Ces composés sélectionnent des mutations situées au niveau de leur site de fixation qui affecte la flexibilité de l'enzyme, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN. Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisqu'une mutation au niveau de la poche hydrophobe confère une résistance croisée entre Efavirenz et Nevirapine, INNTI de première génération. 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'Etravirine(43).

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

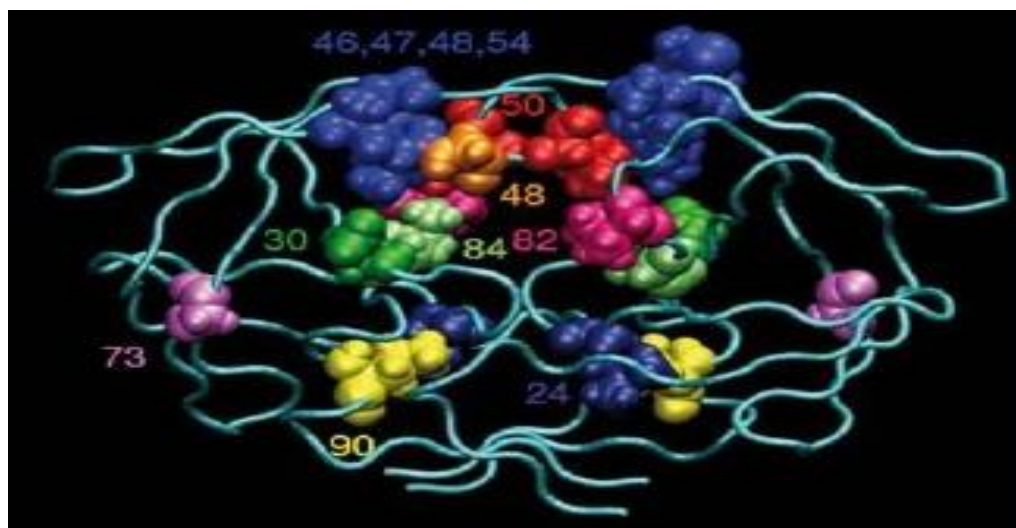
### **3.6.8.6 Inhibiteurs de protéase (IP):**

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(44).





## **Figure 8 : Position des principales mutations de résistance aux IP**

### **3.6.8.7 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 (HeptadRepeat), localisées dans le 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 T20 ont été identifiées *in vitro* mais aussi *in vivo* chez des patients échappant à l'enfuvirtide dans les essais cliniques(41) . Ces mutations sont situées au niveau des codons 36 à 45 du 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 T20 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 (41). 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 disponible 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 pseudo virus 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)(45). Dans tous les cas, il ne peut être réalisé à partir de l'ARN plasmatique que lorsque les charges virales sont supérieures à 1000 copies /ml. Il existe d'autres tests phénotypiques disponibles de ce cas dans la recherche : le test PhenX-R (InPheno, Basel, Switzerland) et le Toulouse Tropisme Test (TTT, Université de Toulouse-III Paul-Sabatier)(46).

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(47). 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 (48).

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(49).

#### **3.6.8.8 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) et l'elvitégravir en 24 mai 2013(50).

Le Dolutégravir est la troisième molécule de cette classe thérapeutique du VIH. l'OMS recommande d'utiliser de préférence le Dolutégravir(DTG) comme traitement contre le VIH de première et de deuxième intention pour toutes les populations, y compris les femmes enceintes et celles en âge de procréer(51).

En ce qui concerne l'élvitégravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment les mutations E92G/Q ou N155H ou Q148R/K (52). Il existe une résistance croisée très importante entre la Raltégravir et l'élvitégravir.

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

Un nouvel inhibiteur d'intégrase, le S/GSK1349572 (le Dolutégravir), ayant un profil de résistance différente du Raltégravir et de l'élvitégravir. Cette molécule est actuellement efficace sur des virus résistants aux molécules de 1<sup>ère</sup> génération mais reste résistant à tous les virus qui portent la mutation Q148R/K. Dans une étude théorique Maïga 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 2ème génération telle que le Dolutégravir.

### **3.6.8.9 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 ViroSeqGenotyping 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(41).

#### **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.

# **METHODOLOGIE**

## **4 METHODOLOGIE :**

### **4.1 Type et période d'étude :**

Il s'agit d'une étude prospective et transversale qui s'est déroulée de janvier 2018 à décembre 2020.

### **4.2 Cadre et lieu d'étude :**

L'étude s'est déroulée au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la tuberculose (SEREFO) actuellement appelé UCRC et a concerné les enfants et adolescents VIH+ sous traitement du Centre d'Excellence de Prise en Charge Pédiatrique du VIH /Sida

#### **4.2.1 SEREFO/UCRC :**

Le Centre Universitaire de Recherche Clinique a été créé en 2013 à travers un partenariat entre le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique, le ministère de la santé et de l'hygiène publique du Mali, de l'université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (USTTB), et des instituts Nationaux de la santé (NIH), Bethesda, Maryland le centre est situé au CHU du Point G, Bamako, Mali.

UCRC a pour but d'améliorer les infrastructures et les ressources nécessaires pour faciliter la recherche clinique au Mali. L'UCRC fournit des services de bases de données cliniques et dans le diagnostic médical. Il aide également les investigateurs dans la conception et la mise en œuvre des protocoles de recherche clinique

Les activités de SEREFO/UCRC 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 chaque année par NIH dans lequel est pratiquée principalement la culture des mycobactéries.

Il y existe un laboratoire de sérologie (pour le diagnostic du VIH), un laboratoire de biologie moléculaire permettant de réaliser la PCR 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.

**4.2.2 Organisation du local de la charge virale :**

Le laboratoire de charge virale 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.

**4.3 Population d'étude**

Enfants et Adolescents infectés par le VIH-1, affiliés dans les centres de prise charge du réseau Enfants et VIH en Afrique (EVA).

**4.4 Critères d'inclusion :**

- Tout enfant traité par ARV en échec thérapeutique (charge virale > 1000 à deux reprises après renforcement de l'observance)
- Être sous traitement plus de six mois
- Enfant en première ligne de traitement incluant le TDF
- Enfant en deuxième ligne de traitement.

**4.5 Critères de non inclusion :**

- ☐ Les patients pour lesquels les prélèvements étaient impossibles,
- ☐ Les patients infectés par le VIH-2,
- ☐ Les patients ayant refusé de participer à l'étude ou non assentiment des parents,

**4.6 Techniques utilisées :**

Nous avons procédé à la quantification de la charge virale plasmatique des patients et 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 par la méthode ANRS.

Les données sur les paramètres démographiques, tel que 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.

#### **4.6.1 Technique Abbott HIV-1 Real Time TM:**

##### **4.6.2 Principe :**

La RT-PCR sur Abbott HIV-1 RealTime™ Quantitative Assay est un test d'amplification de signal de l'ARN cible converti en ADNc grâce à l'activité de transcription inverse de la polymérase thermostable rTth ADNc 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 ADNc double brin : ARN, une deuxième amorce s'hybride avec le brin de l'ADNc et s'étend sous l'activité de l'ADN polymérase afin de créer un produit d'ADNc 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).

##### **4.6.3 Procédure de la technique :**

###### **4.6.3.1 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%. Utiliser du papier buvard pour le nettoyage ;

2. Allumer les bains à sec chauffant : régler le bain des tubes de 12 x 75mm à 50°C et celui des tubes de 1,5mL à 75°C;

3. Décongeler 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) :

-Passé les échantillons 3 fois au vortex ;

- Pour les contrôles, les calibrateurs et le contrôle interne, mélanger le contenu des flacons en les passant au vortex et tapoter 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. Etiqueter 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. Préparer 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 mélanger par retournement 5 à 10 fois tout en évitant la formation de mousse ;

6. Rémettre les particules *microparticules* en suspension en secouant doucement d'avant en arrière jusqu'à ce que les particules soient en suspension ;

7. Préparer 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 :

-Adapter un Combitips de 10mL à la pipette à répétition ;

- Ajouter rapidement 100 µL de particules *mMicroparticules* à chaque tube de 12 x 75 mm à l'aide d'une pipette à répétition ;

- Mélanger le tampon de lyse *mLysis* contenant du contrôle interne par retournement 5 à 10 fois et ajoutez 2,4mL (800µLx3) à l'aide de la pipette à répétition ;

- Transférer les échantillons (prélèvements, calibrateurs et contrôles) vers les tubes de lyse la quantité étant fonction du protocole utilisé ;

- Mélanger les échantillons avec le tampon de lyse par aspiration-refoulement ; (Utilisez des embouts à filtre et changez d'embouts après chaque transfert de liquide)

- Placer 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 12x75mm (rouge) pendant 2 mm ;

10. Retirer soigneusement le lysat de chaque tube à l'aide de pipettes pasteur stériles à bout fin. N'ouvre 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 : Transférer les tubes de 12 x 75 mm vers un support non magnétique immédiatement après le retrait du tampon de lyse :

- ajouter 700  $\mu$ L de solution *mWash* 1 dans chaque tube et remettre les particules magnétiques

en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire ;

- transférer le liquide de lavage et les particules dans un tube microfuge à bouchon à vis de 1,5

mL étiqueté;

- Placer les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute ;

12. Retirer avec soins la solution de *mWash* 1 de chaque tube à l'aide d'embouts de pipettes à filtre. N'ouvrir qu'un tube à la fois et changez d'embouts après tout transfert de liquide ;

13. Second lavage Wash 1 : Transférer les tubes 1,5 mL vers un portoir non-magnétique :

- ajouter 700  $\mu$ L de solution *mWash* 1 dans chaque tube et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincer les particules des parois du tube si nécessaire ;

- Placer les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute;

14. Retirer la solution de *mWash*1 et jeter le liquide ;

15. Premier lavage Wash2 même procédure que le second lavage Wash1

16. Second lavage Wash2 : même procédure que précédemment

17. Retirer la solution de *mWash*2 et jeter le liquide

18. Elution : transférer les tubes de 1,5mL vers un portoir non-magnétique :

- Ajouter 25  $\mu$ L de tampon *mElution* dans chaque tube et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire ;

-Placer les tubes de 1,5mL dans un bain chauffant à 75°C ;

- Incuber pendant 20 minutes ; démarrez la muniterie lorsque vous avez placé le dernier tube dans l'incubateur.

19. Retirer les tubes de 1,5 mL du bain chauffant et les transférer vers un portoir non magnétique ;

20. Ajouter 63  $\mu$ L de solution *mWash* 2 et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration refoulement ; rincer les particules des parois du tube, si nécessaire ;

21. Placer 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 transférer 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 (mélange réactionnel)**

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. Décongeler 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. Mélanger 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'assurer avant le mélange des différents réactifs qu'il n'y a pas de cristaux dans le fond des flacons.
3. Pipeter le master mix contenu dans le flacon d'enzyme dans un tube DNase/RNase free et passer au vortex pour homogénéiser.
4. Retirer la base et couvercle "*StrataCooler96*" (conserver à -20°C) et Portoir de travail en métal pour "*StrataCooler96*" (conserver à +4°C) du réfrigérateur et les montez ;
5. Placer une plaque de réaction optique à 96 puits Abbott dans le "*StrataCooler96*" ;
6. Distribuer le master mix à l'aide d'une pipette réservée à cet usage, distribuer 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 ;
7. vérifier visuellement le niveau de remplissage (50µL)

### **Ajout de l'éluant (addition de l'ARN) au master mix :**

Cette étape est réalisée dans le secteur1.

1. Transférer 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. Homogénéiser le mélange réactionnel en aspirant et rejetant la solution dans le puits 3 à 5 fois ; utiliser un embout de pipette différent pour chaque transfert d'éluât d'échantillon ;
3. Vérifier visuellement le niveau de remplissage (qu'un total de 100  $\mu$ L et pas plus a bien été distribué dans chaque puits
4. Sceller 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 Séparer les bandes situées sur les bords en utilisant la ligne perforée ;
- 6 Retirer la plaque à 96 puits du "*StrataCooler96*" et placer-la sur la base de support anti éclaboussures et transférer 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].

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

Interprétation des résultats obtenus sur le m2000rt (en utilisant les volumes 1,0 et 0,6 ml). 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 III: interprétations des résultats**

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

### Technique de l'ANRS

#### - Principe de la technique

La méthode ANRS détecte les mutations dans les régions de la transcriptase inverse (TI) et de la protéase (PR) du gène Pol et fournit un rapport présentant les preuves génétiques d'une résistance virale. Il s'agit d'un système maison préparant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, Nested PCR et à la réaction de séquence.

#### - Procédure :

Elle est réalisée suivant 2 protocoles à savoir le **protocole 1** qui est celui de l'extraction de l'ARN du VIH et le **protocole 2** pour la PCR à partir de l'ARN rétroviral extrait, migration sur gel d'agarose, purification, réaction de séquence, précipitation éthanoïque, séquençage et analyses bio-informatiques

#### **Protocole 1**

##### **Préparation des réactifs**

a) Ajout d'ARN carrier-tampon AVE au tampon AVL

Ajouter 310 µl de tampon AVE au tube contenant 310 µg d'ARN carrier lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl. Dissoudre complètement l'ARN carrier, le diviser en

aliquotes et le stocker à -20°C. Ne pas congeler et décongeler les aliquotes d'ARN carrier-tampon AVE plus de trois fois. Incuber le tampon AVL à 80°C pour dissoudre les cristaux s'il y en a éventuellement. Calculer le volume de tampon AVL et le volume d'ARN carrier-tampon AVE requis en fonction du nombre d'échantillons à traiter avec les formules suivantes :

$n \times 0,56 \text{ mL} = y \text{ mL}$	- n = nombre d'échantillons à traiter ;
$y \text{ mL} \times 10 \text{ } \mu\text{L/mL} = z \text{ } \mu\text{L}$	- Y (ml) = volume de tampon AVL à utiliser ;
	- Z ( $\mu$ l) = volume d'ARN carrier-tampon AVE à ajouter au tampon AVL

b) Reconstitution du tampon aw1

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

c) Reconstitution du tampon aw2

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

**a) Concentration de l'ARN**

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

**b) Extraction de l'ARN**

1. Conserver 140  $\mu$ l de culot (rejeter 860  $\mu$ l de surnageant) dans le tube de 1,5 ml pour le vih1
2. Ajouter 560  $\mu$ l de tampon AVL-RNA carrier-tampon AVE et mélanger par impulsion-vortex 15 secondes ;
3. Incuber à la température du laboratoire (15-25°C) pendant 10 minutes pour assurer la lyse complète des particules virales ;

4. Faire une brève centrifugation (8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C) pour enlever des gouttes à l'intérieur du couvercle ;
5. Ajouter 560 µl d'éthanol (96-100%) au lysat et mélanger par impulsion-vortex 15 secondes pour précipiter l'acide nucléique (ARN rétroviral). Après mélange, faire une brève centrifugation (8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C) pour enlever des gouttes à l'intérieur du couvercle ;
6. Bien identifier la colonne à filtre et la mettre dans un tube collecteur. Mettre 630 µl du précipité directement sur le filtre (sans toucher le filtre) et centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour permettre la capture de l'ARN rétroviral sur les filtres ;
7. Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter le reste du précipité directement sur le filtre de la colonne à filtre (sans toucher le filtre) et centrifuger à nouveau à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour optimiser la capture de l'ARN rétroviral sur les filtres ;
8. Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter 500 µl d'aw1 (mélangé par impulsion-vortex 15 secondes). Centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour le 1<sup>er</sup> lavage ;
9. Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et ajouter 500 µl d'aw2 (mélangé par impulsion-vortex 15 secondes). Centrifuger à 14000 tours/minute pendant 3 minutes à 20°C pour le 2<sup>ème</sup> lavage ;
10. Transférer la colonne à filtre sur un autre tube collecteur et centrifuger à vide à 14000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C pour éliminer les traces de tampon aw2;
11. Transférer la colonne à filtre sur un tube eppendorf stérile de 1,5 ml bien identifié et ajouter 60 µl de tampon ave puis incuber 1 minute à la température ambiante ;
12. Centrifuger à 8000 tours/minute pendant 1 minute à 20°C ;
13. Jeter la colonne à filtre et boucher le tube stérile contenant les ARNs élués. Conserver l'éluât à -80°C.

## **Protocole 2**

### **RECONSTITUTION DES OLIGONUCLEOTIDES (AMORCES)**

Les amorces sont fournies dans des tubes sous forme lyophilisée.

- ✓ Il faut faire des aliquotes à 100 µm en se servant de la fiche technique des oligonucléotides pour connaître le volume d'eau à ajouter.
- ✓ Faire ensuite des aliquotes de 6 µl de la solution à 100 µm qui serviront ultérieurement pour les PCR

### AMPLIFICATION PAR PCR

a) Reverse transcription / amplification (RT/PCR) ; kit titan (roche)

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

- Pour la protéase :
- 5'PROT1: 5'-TAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC-3'
- 3'PROT1: 5'-GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCA-3'
- Pour la transcriptase inverse :
- MJ3 : 5'-AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA-3'
- MJ4: 5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC-3'

**Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour une réaction de RT/PCR du VIH1**

	Concentration stock	Volume par tube (µl)
<b>Tampon 5x (buffer)</b>	5x	10
<b>Dithiothréitol (ddt)</b>	100 mm	2.5
<b>Dntp mix</b>	10 mm	4
<b>Amorce sens</b>	30 µm pour le vih-1 20 µm pour le vih-2	1
<b>Amorce antisens</b>	30 µm pour le vih-1 20 µm pour le vih-2	1
<b>Rnase inhibitor</b>	5u/µl	1
<b>Enzyme mix</b>	—	1
<b>H<sub>2</sub>O (qualité biologie moléculaire)</b>	—	19.5
<b>Arn patient</b>	—	10
	<b>Volume final</b>	50

#### Conditions d'amplification de la première PCR pour le VIH-1

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



	68°C	1 min 30 s ( <b>vih-1</b> )	
<b>Elongation</b>	68°C	7 min	1 x

**a) Nested PCR (PCR nichée) kit EXPAND high fidelity (Roche)**

Pour la protéase :

- 5'PROT2: 5'- TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'
- 3'PROT2: 5'- AAT GCT TTT ATT TTT TCT GTC AAT GGC-3'
- Pour la transcriptase inverse :
- A35: 5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'
- NE135: 5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'

**Tableau V: Composition du mélange réactionnel pour la réaction de Nested PCR pour**

	<b>Concentration stock</b>	<b>Volume par tube (µl) (pour 50 µl de volume final)</b>
<b>Tampon 10x (expand buffer 10x)</b>	10 x	5
<b>Dntp mix</b>	10 mm	1
<b>Amorce sens</b>	30 µm	1
<b>Amorce antisens</b>	30 µm	1
<b>Expand enzyme polymérase</b>	3,5 u/µl	0,4
<b>H<sub>2</sub>O (qualité biologie moléculaire)</b>	—	36,6
<b>Adn obtenu après la 1<sup>ère</sup> PCR (amplicon)</b>	—	5
	<b>Volume final</b>	50

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

<b>Températures</b>		<b>Cycles Temps</b>	
<b>Activation enzymatique + dénaturation</b>	95°C	3 min	1 x
<b>Cycles d'amplification</b>	94°C	15 s	10 X
	55°C	30 s	
	72°C	2 min	
	94°C	30 s	20 x
	55°C	* 30 s	

	72°C	2 min et 5 s d'incrémentation	
<b>Elongation</b>	72°C	7 min	1 x
<b>Conservation</b>	8°C	∞	—

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

## **I. MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE**

### **a) Préparation du tampon tube 10x (pour 1 litre)**

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

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

### **b) Préparation du tampon tube 1x (pour 1 litre)**

Diluer au dixième le tampon tube 10x pour obtenir le tampon tube 1x.

(Ex : 100 ml de tube 10x ajouter 900 ml d'eau distillée pour obtenir 1000 ml de tube 1x).

### **c) Préparation du gel d'agarose (1%)**

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

- 1g d'agarose
- 100 ml de tampon tube 1x
- Agiter le mélange
- Mettre la fiole au four à micro-onde pendant 2 minutes à 100°C
- Faire refroidir sous un robinet d'eau
- Ajouter 5µl de bet
- Mélanger
- Couler 50 ml par support après avoir mis les peignes en place
- Laisser refroidir environ 20- 30mn

- Enlever les peignes
- Le gel est prêt à être utilisé.

#### **d) Electrophorèse en gel d'agarose**

- Déposer le support contenant la gélose dans la cuve à électrophorèse posée sur une surface noire
- Mettre le tampon tube 1x dans la cuve à électrophorèse jusqu'au niveau des électrodes
- Sur du para film déposer 2µl de bleu de charge et 8µl d'amplicon
- Bien homogénéiser et déposer le mélange dans le puits laissé par le peigne dans la gélose
- Laisser migrer pendant 20 minutes à 110v- 85 ma
- Déposer le gel sur la plaque à UV (spectroline)
- Eteindre la lumière de la salle et allumer les UV
- Observer les migrations qui se caractérisent par une fluorescence orange dans la gélose à la même distance de migration que le témoin positif.

## **II. PURIFICATION DE L'ADN AVEC LE KIT QIAGEN**

- Identifier la colonne munie de filtre
- Mettre 250 µl de tampon bep sur le filtre sans le toucher
- Ajouter le reste des amplicons positifs après l'électrophorèse en gel d'agarose et homogénéiser avec la pipette
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Enlever la colonne et verser le filtrat
- Placer à nouveau la colonne sur le tube collecteur et ajouter 750µl de solution de lavage
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Enlever la colonne et verser le filtrat
- Placer à nouveau la colonne sur le tube collecteur et centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Identifier une série de tubes de 2 ml en vue de recueillir l'éluât
- Remplacer les tubes collecteurs par les nouveaux tubes de 2ml identifiés
- Ajouter 60µl d'eau ppi sur le filtre puis laisser incuber 5mn
- Centrifuger à grande vitesse (13000tr/mn) pendant 1 minute
- Jeter les colonnes et conserver le gène purifié à -20°C.

## **III. REACTION DE SEQUENCE**

- 1- Remplir correctement la feuille de paillasse de séquençage et apprêter la plaque de séquençage.

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

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

- Pour la protéase :
- 5'PROT2: 5'- TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'
- 3'PROT2: 5'- AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC-3'
- Pour la transcriptase inverse :
- A35: 5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'
- NE135: 5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'

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

	Concentration	Volume par tube (µl) (pour 12 µl de volume final)
Big dye Terminator (bdt)	—	1
Tampon (buffer)	5x	1,5
Amorce	4µm	4
H <sub>2</sub> O (qualité biologie moléculaire)	—	4,5
Adn purifié	20 – 50ng/µl	1
	<b>Volume final</b>	12

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

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

IV.

## V. PRECIPITATION ETHANOLIQUE

- Enlever la plaque du thermocycleur
- Ajouter 16 µl d'eau ppi
- Puis 64 µl d'éthanol 95-100%
- Bien homogénéiser avec la micropipette
- Fermer avec du papier autocollant
- Incuber à la température du laboratoire pendant 40 minutes à l'abri de la lumière (peut être conservée toute la nuit)
- Centrifuger à 2700 g (rcf) pendant 30 minutes
- Renverser la plaque délicatement sur du papier buvard et tapoter légèrement
- Ajouter 150 µl d'éthanol à 70%
- Fermer avec du papier autocollant
- Centrifuger à 2000 g (rcf) pendant 10 minutes
- Renverser délicatement la plaque, la tapoter sur du papier buvard
- Emballer la plaque dans du papier buvard, puis avec du papier aluminium. Ne pas fermer. La mettre retournée dans les plots de la centrifugeuse pour enlever toute trace de liquide
- Centrifuger à 700 g pendant 1 minute
- Ajouter 20 µl de formamide dans chaque micro-tube (utiliser les bacs de distribution et la pipette multicanaux).
- Tapoter légèrement pour faire descendre toute la solution de formamide
- Fermer avec un septum
- Agiter vigoureusement
- Conserver la plaque au réfrigérateur

## VI. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

- Mettre en route le disjoncteur situé à l'arrière du séquenceur
- Mettre en marche l'unité centrale
- Saisir le mot de passe (**instar-admin**)
- Une fois que tous les programmes sont chargés, allumer le séquenceur
- Attendre que le voyant vert du séquenceur soit allumé
- Lancer le programme **run 3130-avant data collection série 4**
- Faire **tray** pour appeler le chariot contenant la plaque
- Ouvrir les portières et enlever délicatement la plaque (**l'emplacement de la plaque sur l'écran devient gris**)

- Remplacer le tampon EDTA 1x et l'eau des différents bacs (rincer les bacs à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et essuyer avant de les remplir jusqu'au trait marqué sur le bac)
- Fermer les bacs avec des septa propres et secs
- Placer les différents bacs à leur emplacement
- Changer de même le tampon EDTA 1x de l'anode après avoir rincer le verre à l'eau pi (ne pas le rincer à l'eau de robinet)
- Mettre le tampon jusqu'au trait rouge

### **Création d'un enregistrement de plaque**

- Sélectionner **plate manager**
- **New**
- **Name :**
- **Description :** séquençage HIV et patients (**pas obligatoire**)
- **Application :** seqencing analysis
- **Plaque :** 96 puits
- **Owner name :**
- **Operator name :**
- **ok**

### **Création d'une feuille de paillasse**

Ecrire d'abord l'identité de l'échantillon avant de sélectionner les paramètres

	<b>Sample name</b>	<b>Comment</b>	<b>Priority</b>	<b>Results groupe1</b>	<b>Instrument Protocol</b>	<b>Analysis Protocol</b>
<b>A1</b>	1	Pas obligatoire	3	4	5	6

### **Légende (a1) :**

- 1 : ex **akpbri\_pr\_5p2** (ne pas mettre d'espace)
- 3 : **seqpop7\_50\_bdt3.1** (pour séquençage, polymère 7, longueur du capillaire 50, chimie utilisée bdt 3.1)
- 4 : **3130pop7\_bdtv3.1.kb**. Puis Ok

### **Dénaturation**

- Mettre la plaque dans le thermocycleur pendant 2-5mns à +95°C
- Retirer la plaque et la mettre aussitôt dans un bac contenant de la poudre de glace pendant au moins 5 minutes

- Nettoyer la plaque sortie de la glace pour enlever toute trace d'eau

### **Chargement**

- faire **plate-view**
- faire **find all** et sélectionner la plaque (ex : thomas\_hiv1\_290610 (date))
- faire **run scheduler**
- faire **tray** pour appeler le passeur d'échantillons et ouvrir les portières
- placer la plaque sur le passeur d'échantillons par l'encoche et abaisser le côté opposé qui doit rentrer entre les électrodes sans forcer (**l'emplacement de la plaque devient jaune**)
- fermer les portières
- cliquer sur la plaque pour demander à la machine de lier la feuille de paille à la plaque (**la plaque devient verte**)
- cliquer sur le symbole (triangle) vert dans la barre d'outils (ok)
- le séquenceur démarre
- faire **instrument setting** pour suivre la progression de l'analyse.

## **VII. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES**

Le génotype de résistance est réalisé en utilisant la technique développée par l'ac11 de L'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Après le séquençage des gènes de la protéase et de la transcriptase inverse sur le séquenceur automatique 3130-avant (applied biosystems, courtaboeuf, France), les séquences sont alignées avec les séquences de références du vih-1 (hiv-1 hxb2, numéro accession genbank : k03455) et du vih-2 (hiv-2 Rod). L'interprétation des mutations de résistance se fait en utilisant les dernières mises à jour de l'algorithme de L'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

L'analyse bio-informatique des séquences est réalisée en utilisant les logiciels tels que :

### ✓ **Le logiciel seqencing analysis (seq a)**

Il a été utilisé pour visualiser les données obtenues par le séquenceur. Ces données sont visualisées sous la forme de séquences nucléotidiques et d'électrophorégrammes. Cette visualisation permet de juger de prime abord la qualité des séquences nucléotidiques.

### ✓ **Le logiciel seqscape**

Il est utilisé pour analyser les données obtenues par le séquenceur. Il permet d'effectuer un prétraitement des données et de sélectionner les séquences nucléotidiques exploitables.

### ✓ **Les logiciels clustal w et BioEdit**

Les séquences exploitables sont alignées à l'aide du logiciel clustal w, implanté dans le programme bioedit version 7.2.5 avant de les comparer aux séquences de références du vih-1 (hiv-1 hxb2, numéro accession genbank : k03455) et du vih-2 (hiv-2 rod). Cette comparaison

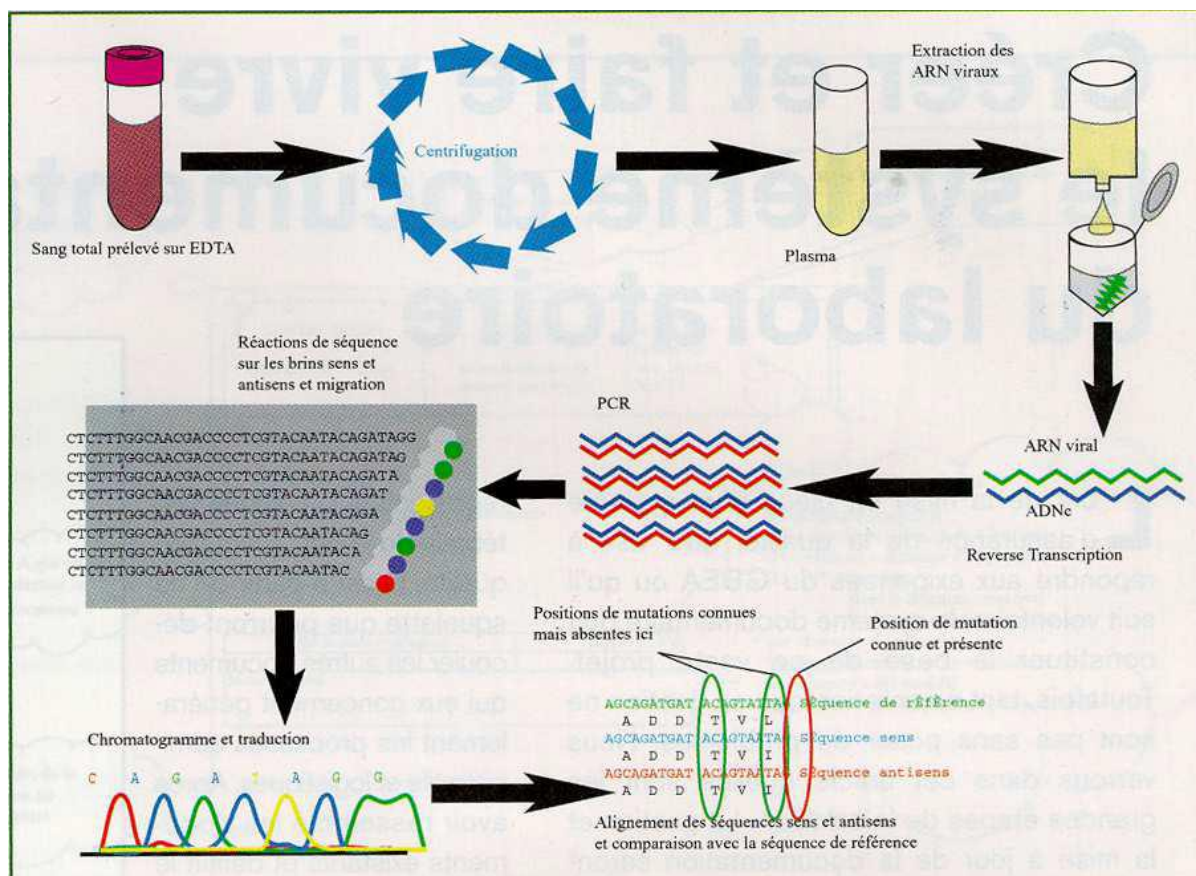
des séquences se fait sur le site de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). L'interprétation des résultats se fait en utilisant les dernières mises à jour de l'algorithme de L'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Elle permet d'identifier les mutations, de comprendre leurs implications dans la résistance aux ARV et de décrire la variabilité génétique du virus.

**Mode opératoire :**

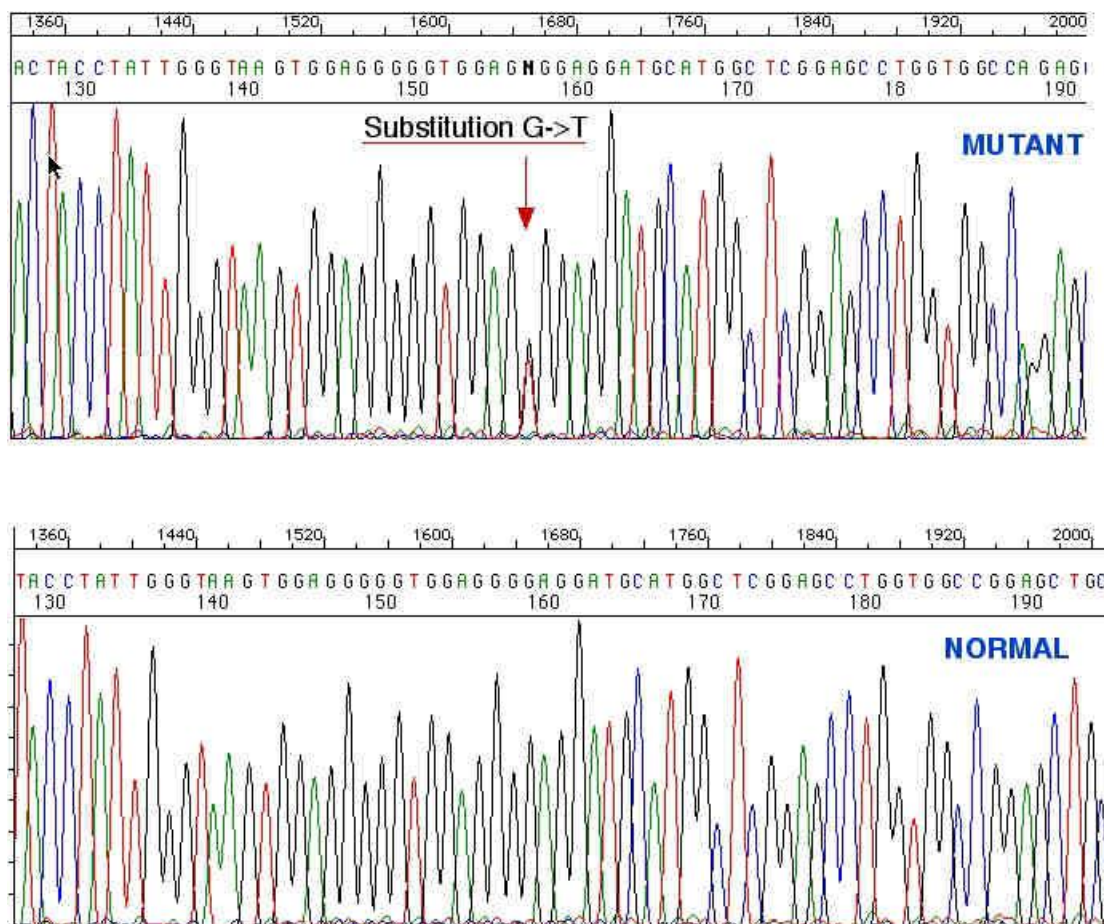
H. Alignement des séquences :

L'alignement des séquences s'effectue à l'aide du logiciel seqscape v2.7. Ce logiciel Permet de les comparer par rapport à une souche de référence (hxb2), afin de repérer les éventuelles mutations responsables de résistance aux antirétroviraux. En annexe 07 est présenté un modèle de rendu par L'ANRS. Les interprétations des différents génotypes sont régulièrement mises à jour par L'ANRS.

**Figure 9: Schéma de la méthodologie du génotypage**







#### 4.6.3 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 Vacutainer™ PPTM, 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 :**

La réalisation du génotypage a été réalisée en lien avec le laboratoire SEREFO de virologie qui a transmis le papier buvard. Chaque carte était conditionnée et transportée dans un sachet contenant 2 à 3 sachets déshydratants de stockage de cartes à 2-8 degré Celsius ou 10 au moins.

✓ **Conservation des échantillons :**

Avant le spot, le sang total recueilli dans un tube de prélèvement sanguin conservé à 15 -30 degré Celsius jusqu'à 24h et à 2-8 jusqu'à 48h.

**4.7 Echantillonnage :**

La taille de l'échantillon de notre étude est limitée à 28 patients, considérant que la prévalence de la résistance pourrait être significative après un échec virologique des traitements antirétroviral chez les patients infectés par le VIH-1 ou VIH-1+2.

**4.8 Analyse des données :**

Nos données sont saisies par le Microsoft Word/Excel 2016 et analysées par le logiciel SPSS version 2.0

# RESULTATS

## 5 Résultats

Notre étude a porté sur 28 patients au Mali, Cote d'Ivoire, Burkina et Sénégal infectés par le VIH-1 et en échec de leur traitement ARV incluant le TDF. Sur les 28 cas, 24 ont été amplifiés à la RT et 25 à la PR ; 21 cas présentaient de la résistance au moins à une molécule des trois classes d'ARV, soit 75% des cas.

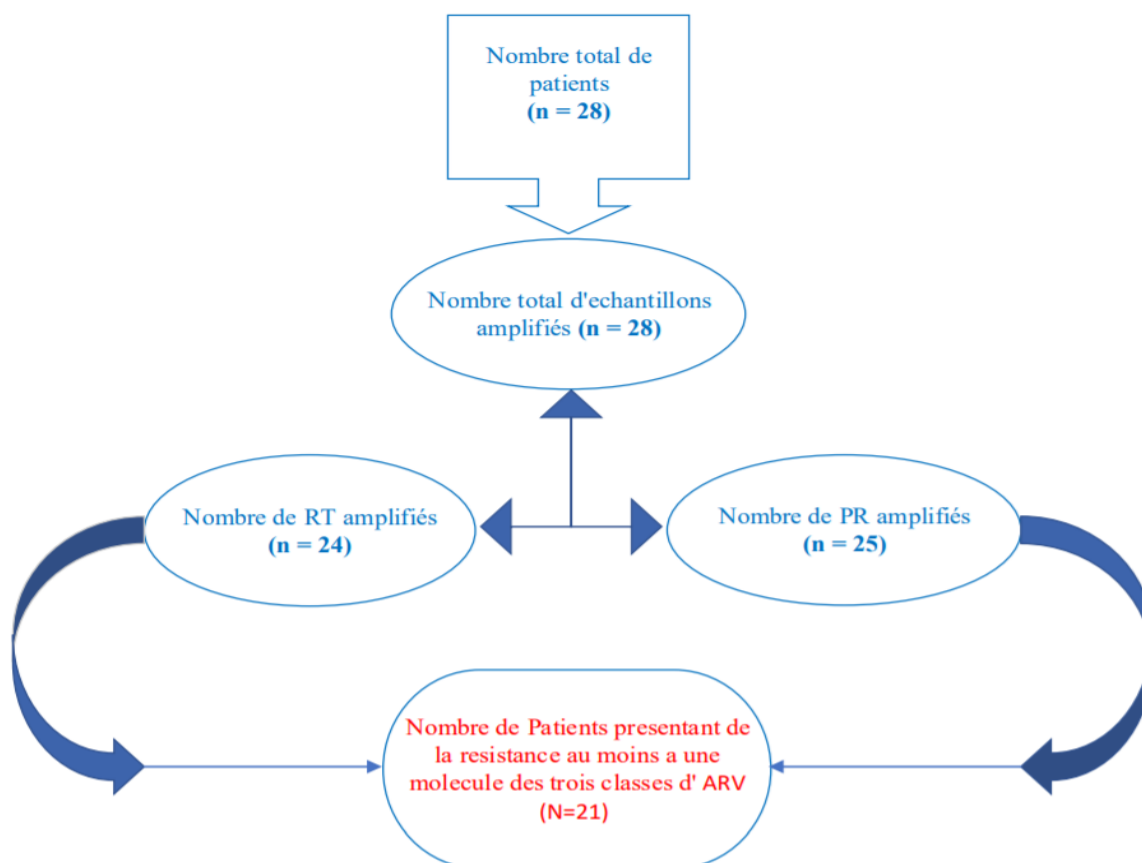


Tableau IX: Répartition des patients en fonction de l'âge.

Age (ans)	Pourcentage	Effectifs
11 à 14	7	25
15 à 17	17	61
18 à 20	4	14
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

La tranche d'âge de 15- 17 ans était la plus représentée dans 61 % (17/28) des cas. L'âge moyen était de 15,5 ans  $\pm$  2 avec des extrêmes de 11 et 20 ans.

**Tableau X : Répartition des patients en fonction du sexe :**

<b>Sexe</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
Masculin	18	64,3
Féminin	10	35,7
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Le sexe masculin était plus prédominant dont 64,3% avec un sex ratio de 1,8.

**Tableau XI: Répartition des patients en fonction du stade clinique OMS à l'inclusion**

<b>Stade clinique (OMS)</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
Stade 1	5	17,8
Stade 2	3	10,7
Stade 3	8	28,6
Stade 4	12	42,9
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Concernant les stades clinique, 42,9 % (12/28) des cas étaient classés stade 4 de l'OMS.

**Tableau XII: Répartition des patients en fonction du taux de Lymphocytes T CD4+ à l'inclusion**

<b>Nbre de CD4+ c/mm<sup>3</sup></b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
< 350	4	14,2
351 – 500	8	28,5
> 500	16	57,1
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Le taux de Lymphocytes T CD4+ supérieur à 500 cellules/mm<sup>3</sup> représentait 57,1% (16/28) des cas.

**Tableau XIII: Répartition des patients en fonction du niveau de la charge virale au moment de l'échec virologique.**

<b>Charge virale Cp/ mm<sup>3</sup>,</b>	<b>Effectifs</b>	
<b>Pourcentage</b>		
[1000-10000]	11	39,3
[10001-100000]	12	42,8
> 100000	5	17,9
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Sur les 28 patients, 42,8% (12/28) avaient une charge virale comprise entre 10001 et 100000 copies/ ml.

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

<b>Durée du traitement</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>ARV/mois</b>		
≤ 60	14	50
> 60	14	50
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

La durée moyenne du traitement sous ARV était de 64,74 mois avec des extrêmes de 6 et 168 mois. L'écart type = 54,73

**Tableau XV: Répartition des patients en fonction du traitement ARV à l'initiation.**

<b>Traitement à l'initiation</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
ABC+3TC+EFV	4	14,3
AZT+3TC+EFV	13	46,4
AZT+3TC+NVP	5	17,9
D4T+3TC+NVP	4	14,3
TDF+3TC+EFV	2	7,1
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Par rapport au traitement ARV, 46,4 % des patients étaient sous AZT+3TC+EFV, suivis de 17,9 % des patients sous AZT+3TC+NVP.

**Tableau XVI: Répartition des patients en fonction du schéma thérapeutique à l'échec**

<b>Schéma thérapeutique à l'échec</b>	<b>Effectifs</b>	<b>pourcentage</b>
TDF+3TC/FTC+EFV	19	67,9
TDF+3TC/FTC+LPV/r	9	32,1
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Le schéma thérapeutique à l'échec était le TDF+3TC/FTC+EFV dans 67,9 % des cas, suivi du TDF+3TC/FTC+LPV/r dans 32,1 % des cas.

**Tableau XVII: Répartition des patients en fonction de la résistance aux ARV.**

<b>Résistance aux ARV</b>		<b>effectifs</b>
<b>Pourcentage</b>		
<b>Patients avec résistance</b>	<b>21</b>	<b>75.0</b>
Patients sans résistance	7	25.0
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

Sur 28 patients inclus dans notre étude, nous avons enregistré 21 patients présentant de résistance aux ARV, soit une prévalence de 75 %.



**Tableau XVIII: Répartition des enfants résistants au TDF en fonction de l'âge.**

Age (ans)	Patient résistant au TDF		TOTAL	Khi2	p valeur
	Non	Oui			
11 à 14	3	4	7		
15 à 17	12	5	17	2,01	0,36
18 à 20	3	1	4		
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>28</b>		

Sur les 10 patients ayant présentés un profil de résistance aux ARV, 50% (5/10) avait un âge compris entre 15 et 17 ans.

**Tableau XIX: Répartition de la résistance aux ARV en fonction du sexe.**

Sexe	résistance au TDF		TOTAL	Khi2	p valeur
	NON	OUI			
Masculin	12	5	16		
Féminin	6	5	8	2,48	0,28
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>28</b>		

Répartition de la résistance aux ARV en fonction du sexe, on notait une répartition équitable des deux sexes en fonction.

**Tableau XX: Répartition de la résistance aux ARV en fonction de la durée du traitement.**

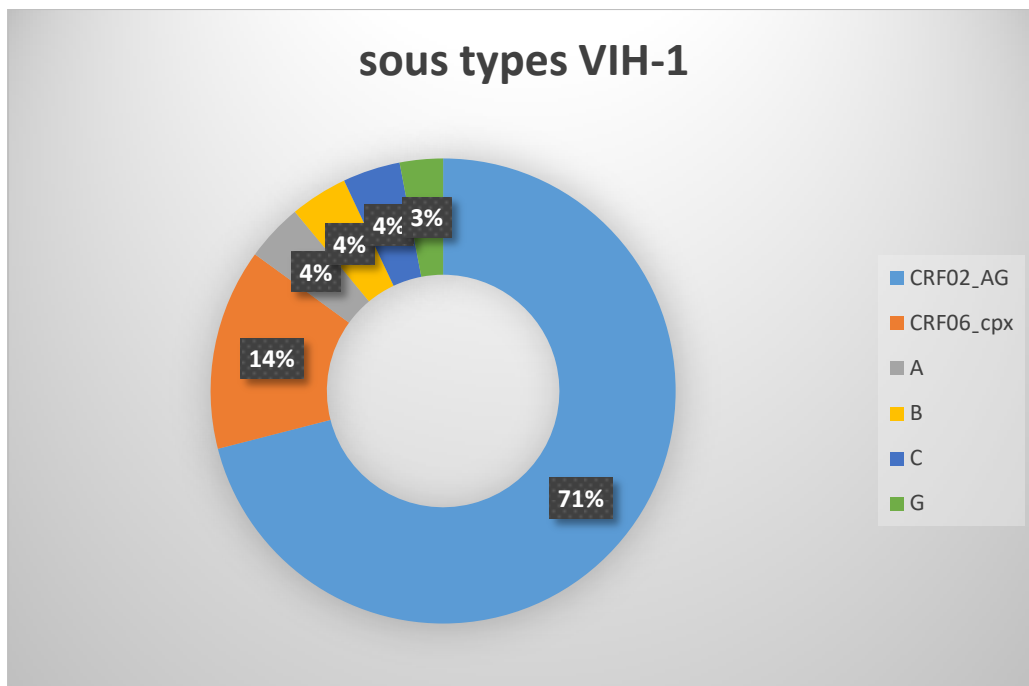
Durée de la résistance au TDF	TOTAL			Khi2	p valeur
	NON	OUI			
≤ 60	8	2	7		
>60	10	8	17	5,74	0,008
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>28</b>		

Par rapport à la durée du traitement, 80% (8/10) des patients ayant développé un profil de résistance ont eu une durée de traitement supérieure à 60 mois, avec **p valeur** significative. Ce qui signifie qu'il y'a un lien entre l'apparition des mutations de résistance et la durée sous traitement ARV.

**Tableau XXI: Répartition de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale à l'échec.**

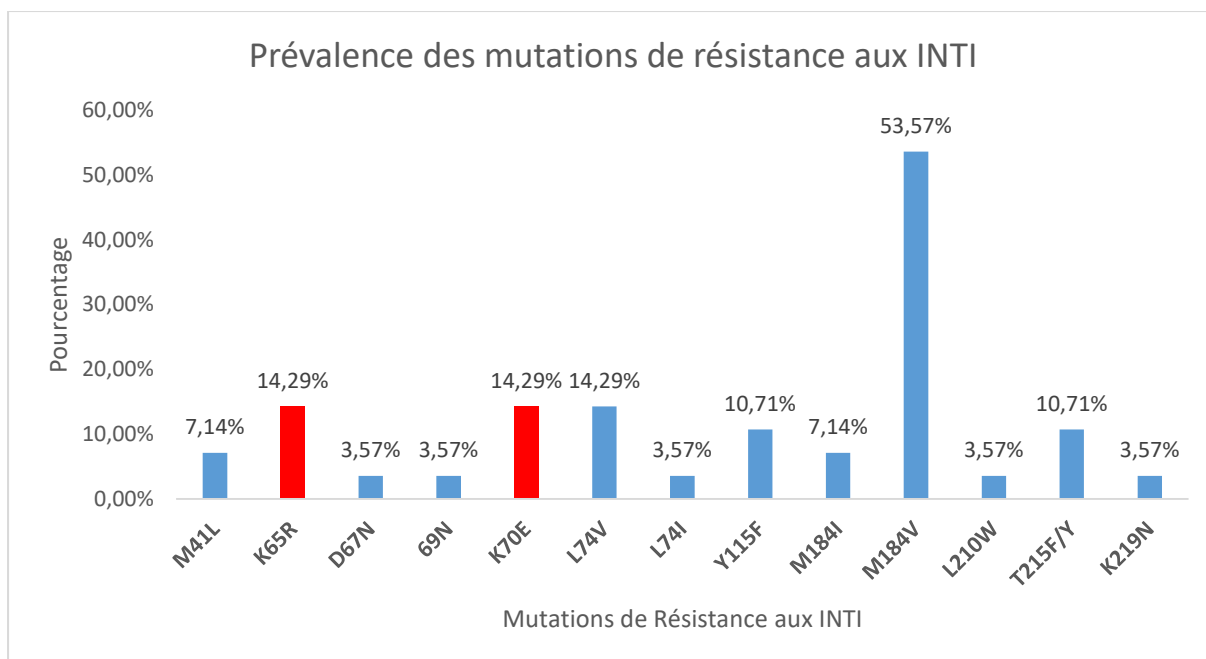
Charge virale Cp/mm3	résistance au TDF		TOTAL	Kih2	p valeur
	NON	OUI			
1000 - 10000	9	1	6		
10001 - 100000	8	6	14	5,52	0,23
Plus de 100000	1	3	4		
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>28</b>		

Sur les 10 patients ayant un profil de résistance ,60%(6/10) des patients ayant un profil de résistance au TDF, avaient une charge virale comprise entre 10 001 et 100 000 copies/ml.



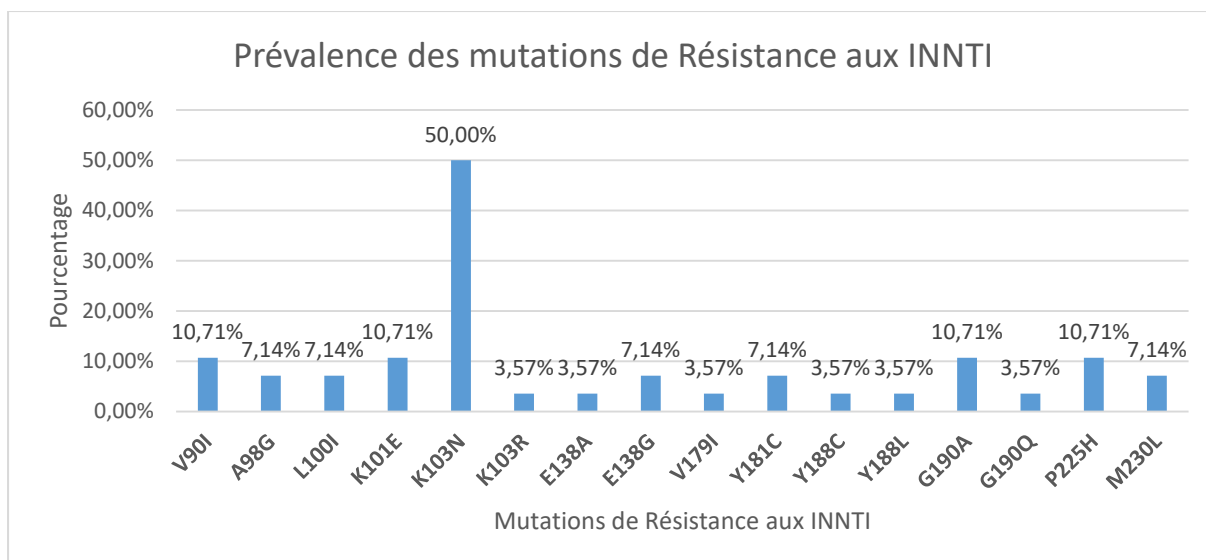
**Figure 10 : répartition de nos patients, en fonction des sous types du VIH-1.**

Parmi les formes recombinantes qui circulent, le CRFO2\_AG était le sous-type qui prédominait avec 71% des cas.



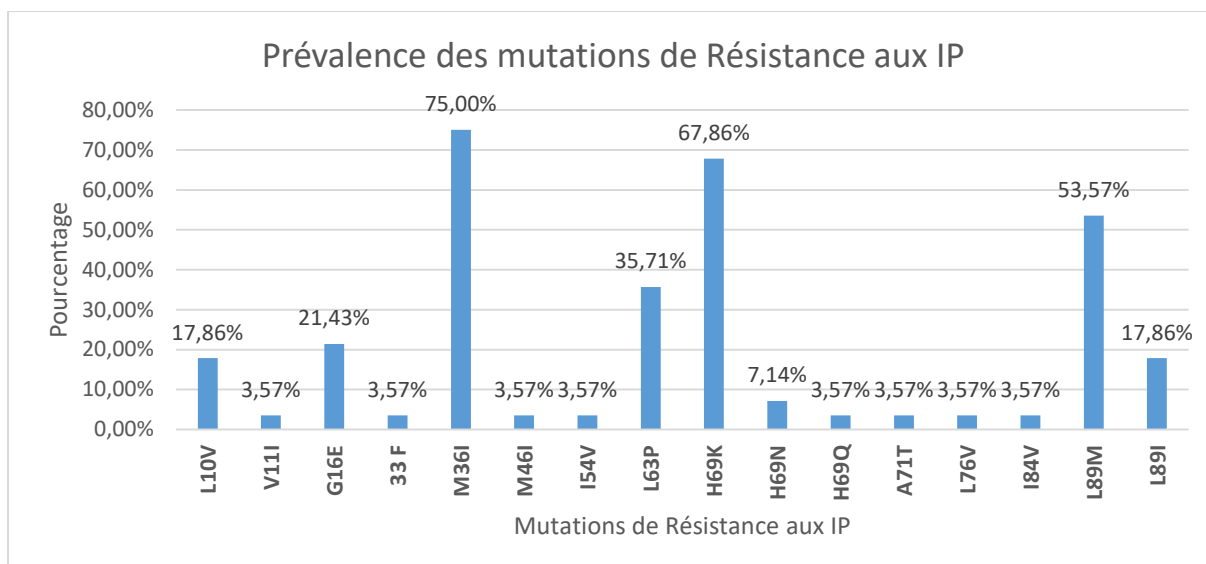
**Figure 11: Prévalence des mutations de résistance aux INTI.**

La mutation M184V confère principalement de la résistance aux molécules 3TC/FTC et secondairement à ABC était la plus représentée dans 53,57% des cas, suivie de la K65R, K70E qui sont sélectionnées préférentiellement sous TDF, soit 14,29% chacune.



**Figure 12 : Les mutations de résistance associées aux INNTI**

Cinquante pour cent des patients étaient porteurs de la mutation K103N conférants une résistance à EFV et NVP, suivie des mutations V90I, K101E conférant de la résistance à la RPV et l'ETR soit 10,71% des cas.



**Figure 13: Mutations de Résistance aux IP**

Soixante-quinze pour cent de nos patients étaient porteurs de la mutation de résistance M36I, suivi de H69K, L89M, qui représentait respectivement 67,86% et 53,57% de cas. Ce sont des mutations associées à la résistance à la Tipranavir.

## **6 Commentaire et discussion :**

### **6.1 Atteintes des objectifs de l'étude :**

Notre étude descriptive, multicentrique et prospective était et portait sur le profil de résistance des enfants aux ARV. Elle s'est déroulée dans les centres de prise en charge des enfants vivants avec le VIH de type 1 sur une période allant de janvier 2018 à décembre 2020 et a porté sur 28 patients.

#### **La discussion des résultats a porté sur :**

La technique utilisée, les aspects sociodémographiques, le traitement antirétroviral, la prévalence, le profil de résistance au TDF, la diversité génétique des sous types du VIH-1, et les mutations de résistance.

### **6.2 Technique utilisée :**

Les tests génotypiques de résistance sont très importants dans la gestion optimale des traitements ARV, le choix des meilleurs traitements de substitution et limiter ainsi le développement de la multi résistance. Nous avons utilisé le séquençage et les outils bio-informatiques d'analyse des séquences d'ADN dans notre démarche méthodologique afin de mieux apprécier la diversité génétique et les mutations sur le gène Pol, et le gène de la Transcription Inverse, dont les rôles sont essentiels dans le traitement ARV. La méthode ANRS détecte les mutations dans les régions de la transcriptase inverse (TI) et de la protéase (PR) du gène Pol et fournit un rapport présentant les preuves génétiques d'une résistance virale. Il s'agit d'un système maison préparant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, Nested PCR et à la réaction de séquence.

### **6.3 Caractéristiques sociodémographiques et biologie :**

Ces données ont été collectées à l'aide de la fiche de demande du génotypage.

Dans notre série, l'âge moyen était de  $15,5 \pm 2$  ans avec des limites allant de 11 et 20 ans. La tranche d'âge de 15- 17 ans était la plus représentée dans 61 % (17/28) des cas. Ceci est comparable à celui de Oumar Dolo et al (53) « en 2014 à Bamako sur 14 patients »

On notait une prédominance du sexe masculin à 64,3% et une sex-ratio de 1,8 malgré la féminisation du VIH en Afrique. Ce résultat est similaire avec celui de Fatoumata A et al (54) « en 2017 à Bamako sur 41 adolescent » qui ont retrouvé 63,41%. Par contre ,d'autres études ont montré une différence , Salou M et al(55) « en 2016 au Togo sur 283 patients infectés » et de Diawara M (56) « en 2013 à Bamako sur 92 patients » ont tous retrouvé respectivement une prédominance féminine à 60,2 et 60,90%. Ces résultats confirment la féminisation du VIH en Afrique.

Les patients avec un taux de Lymphocytes T CD4+ supérieur à 500 cellules/mm<sup>3</sup> représentaient 57,1% des cas après 60 mois sous traitement. Fatoumata A et al(54) « en 2019 à Bamako sur 41 adolescents » ont trouvé 41,48% à 12 mois de traitement . Cette différence de chiffre pourrait s'expliquer par la durée du traitement.

#### **6.4 Le traitement antirétroviral :**

Nos patients ont été initiés sous TARV par une association contenant 2 INTI + 1 INNTI. Le schéma AZT+3TC+EFV représentait 46,4 % des cas, suivi par 17,9 % des patients étaient sous AZT+3TC+NVP. Celui-ci est comparable avec celui de Coulibaly A et al(53) « en 2014 à Bamako qui retrouvait 43.5%. Par contre, Salou M et al(55) « En 2016 au Togo sur 228 retrouvait 80.6% des cas. Qui peut s'expliquer par la politique de prise en charge thérapeutique en cours qui vise à utiliser la combinaison AZT+3TC+NVP comme alternative de seconde ligne possible 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.

Le schéma thérapeutique à l'échec était le TDF+3TC/FTC+EFV dans 67,9% des cas, suivi de TDF+3TC+LPV/r dans 32,1% des cas ; une autre étude a montré une grande différence (Salou M et al en 2016 à Lomé) qui ont trouvé respectivement 2.8% et 1.7%. Cette molécule possède d'indéniables avantages en termes d'efficacité, de simplicité de prise et de profil de tolérance(57)

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

Le recombinant VIH-1 CRF02\_AG était le sous-type le plus prédominant dans notre population d'étude avec 71% des cas, suivi du CRF06-cpx 14% et du A, B, C respectivement 4%. Des études réalisées en Afrique de l'Ouest ont toutes trouvé que le CRF02\_AG était le sous-type du VIH-1 le plus prévalent en France et en Afrique subsaharienne (58). Une étude réalisée au Mali a montré que le sous-type CRF02\_AG est le sous-type le plus prédominant avec 74% chez les patients non traités Derache A (59).

#### **6.6 La prévalence de la résistance au TDF :**

Sur les 28 patients qui ont été génotypes, 75 % présentait une résistance à la Bithérapie, soit un traitement associant 2 INTI + INNTI ; 10 patients ont présenté une résistance au TDF, soit 36% des cas, après 60 mois sous ARV. Ceci est comparable avec ceux de Coulibaly A et al (53) « en 2014 à Bamako » ont trouvé 29,2 % de résistance à TDF. Par contre , Diawara M (56) « 2013 à Bamako sur 92 patients » a retrouvé chez 88 % des cas de résistance au TDF après 36 mois de traitement, cette différence peut s'expliquer par la petite taille de notre étude.



### **6.7 Profil de résistance au TDF :**

La résistance aux AVR était plus prévalent chez les patients qui avaient une charge virale supérieure à 10000 copies que ceux qui avaient une CV comprise entre [1000-10000] avec 60% de cas. Aussi la résistance était plus visible chez les patients qui étaient âgés de plus de 11 ans que ceux ayant un âge supérieur. La résistance était encore plus chez 80% des patients qui avaient une durée de traitement supérieure à 60 mois. Ceci peut s'expliquer par une durée assez sans suivi biologique régulier. Ce résultat nous montre qu'il y'a un lien entre la durée sous traitement ARV et l'apparition des mutations de résistance aux antirétroviraux. L'analyse statique peut confirmer cela (P valeur = 5,74 supérieurs au seuil de significativité de 5%). Fatoumata A et *al*(54) Et celui de Diawara M (56) , qui ont tous trouvés un lien entre l'apparition des mutations de résistance et la durée sous traitement ARV [51](54) .

### **6.8 Prévalence de mutations de résistance aux INTI :**

Sur les 28 patients qu'ont reçu un test de génotypage, nous avons obtenu des mutations associées à la résistance aux INTI les plus fréquents étaient : le M184V (53.57%), suivi de K65R ET K70E (14.29%). Ces résultats sont comparables à celui de Coulibaly A et *al*(53). et Salou M et *al*(55) qui ont trouvés respectivement M184V (54,17%) et M184V (91,7%). Cette différence avec celle Salou M. pourrait s'expliquer par la taille de l'échantillon soit 110/125.

### **6.9 Prévalence de mutations de résistance aux INNTI :**

Des mutations résistance élevées associées aux INNTI ont été observées dans notre étude : La mutation K103N conférant de la résistance à la NVP et à l'EFV était la plus fréquente soit 50%, suivi des mutations V90I, K10E conférant de la résistance à la RPV et l'ETR soit 10,71% des cas. Ce résultat est similaire à celui de Salou M. soit 47% pour K103N et Coulibaly A et *al* ont retrouvé 37,5%.

### **6.10 Prévalence de mutations de résistance aux IP :**

Les mutations : M36I/L/V, H69K/R/Q, L89M/V/I confèrent de la résistance au tipranavir étaient les plus fréquentes avec respectivement 75%, 67.86% et 53,57% des cas. Ceci pourrait s'explique par le fait que les mutations M36I, H69R et L89M entraînant 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 [15].

## **7 Conclusion et recommandations :**

### **7.2 Conclusion :**

- ❑ 75% de la population étudiée étaient infectés par des souches multirésistantes
  - 36% aux TDF
- ❑ Recombinaut VIH-1 CRF02\_AG était le sous-type le plus prédominant 71% des cas.
- ❑ Traitement antirétroviral pédiatrique reçoit encore des attentions,
  - Lien entre l'apparition des mutations de résistances et la durée sous traitement

### **7.3 Recommandations :**

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

#### **1. Aux personnels dans les Centres d'excellence de prise en charge pédiatrique du VIH/Sida**

Faire un meilleur suivi des patients sur le plan clinique et biologique,

Améliorer l'éducation thérapeutique et l'observance chez les enfants et les parents

Sensibiliser les familles à l'importance de l'examen de charge virale pour leur enfant.

#### **2. Aux pharmaciens et biologistes :**

Rendre les résultats des patients le plus tôt que possible en vue d'une éventuelle prise de décision rapide.

#### **3. Aux autorités sanitaires et administratives :**

Assurer la disponibilité des ARV pédiatriques sur tous les sites de prise en charge du VIH pédiatrique.

Assurer la disponibilité constante des mesures de la charge virale en approvisionnant régulièrement les laboratoires en réactifs et consommables

Assurer la maintenance des appareils.

Rendre les moyens disponibles (ressources humaines, matérielles et financières) pour la continuité des tests de génotypage.

Proposer un test de génotypage avant tout traitement ARV.

#### **4. Aux patients vivants avec le VIH.**

Être adhérent au traitement pour meilleure succès thérapeutique

## **8 REFERENCES**

1. Fleury HJA. *Connaissances et pratique connaissance et pratique virologie humaine*. 5 éd. Bordeaux: Masson; 2009. 245 p.
2. ONUSIDA. Fiche d'information - journée mondiale du Sida 2021. Disponible sur: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_fr.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_fr.pdf)
3. El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med*. 30 nov 2006;355(22):2283-96.
4. Blanc A, Bonnet F, Brun-Vezinet F, Costagliola D, Dabis F, Delobel P, et al. Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH. 2016;15.
5. Masson E. *La résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les enfants infectés : du nouveau-né à l'adolescent*. 2007.
6. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. *Améliorer l'accès au traitement antirétroviraux dans les pays à ressources limitées*. Genève, Suisse; 2002 p. 161.
7. CDC d'Atlanta. *Classification des manifestations cliniques et anomalies biologiques*. 1993;2.
8. ICTV. *Virus de l'immunodéficience humaine*. 1993.
9. Katerina Christina Psomas. *La génomique du VIH*. 2012;(149).
10. ANSM. *Résumé des Caractéristiques du Produit*. 2017.
11. Robert Gallo. *Virus de l'immunodéficience humaine - Cycle de réplication* [Internet]. Techno-Science.net. 1995 [cité 5 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Virus-de-l-immunodeficiency-humaine-page-4.html>
12. Benjouad A, Fenouillet E. *Réponse immune contre les glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine : (Paris)*. 1994;10(5):544.
13. Futura JC. *Sida: les modes de transmission du VIH*. Futura. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-sida-vaincre-vih-1696/page/5/>
14. CPS/SSDSPF Instat info-stat. *Enquête Démographique et de Santé (EDSM-V)*. Bamako; 2012 2013 p. 547.
15. Kouyos RD, von Wyl V, Yerly S, Böni J, Rieder P, Joos B, et al. Ambiguous Nucleotide Calls From Population-based Sequencing of HIV-1 are a Marker for Viral Diversity and the Age of Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 15 févr 2011;52(4):532-9.
16. Coulibaly K. *Genotypage et exploration du polymorphisme nucléotidique de CCR5, récepteur de chimiokines et corecepteur majeur du VIH-1*, Bamako. 2006.
17. Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. *Diversité génétique des VIH et ses conséquences*. *Pathologie Biologie*. 1 mars 2009;57(2):142-8.

18. Jean-Charles Bourgeois. Diagnostiquer le VIH chez les nourrissons et les tout-petits. 2022.
19. Jacomet C. Le dépistage du VIH. 2016.
20. OMS. Intensification de la prévention, du diagnostic, des soins et du traitement liés au VIH pour les nourrissons et les enfants. 2009 p. 79.
21. Claire P. Le séquençage de l'ADN. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/genetique-sequencage-adn-nuls-26754/>
22. <https://www.clicours.com/les-outils-bioinformatiques-danalyse-des-sequences-de-ladn/Les-outils-bio-informatiques-d-analyse-des-séquences-de-l'ADN.>
23. Vincent Richard. Inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH. 2019. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-de-la-transcriptase-inverse-du-vih>
24. De Clercq E. Structures et activités des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH (INNTI). Médecine et Maladies Infectieuses. 1 juill 2000;30(7):421-30.
25. Vincent Richard. Inhibiteurs de la protéase du VIH.2017. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-de-la-protease-du-vih>
26. Maroc Biologie. Mécanisme d'action du VIH - Immunologie Virologie. 2022. Disponible sur: <https://www.biologie-maroc.com/2017/10/mecanisme-daction-du-vih.html>
27. Peytavin G, Calvez V, Katlama C. Les antagonistes du récepteur CCR5 : une nouvelle classe d'antirétroviraux. Therapies. 1 janv 2009;64(1):9-16.
28. Lorin A. Implication des peptides de fusion des glycoprotéines de fusion virales de classe I dans la fusion membranaire. Biotechnol Agron Soc Environ. 1 janv 2007.
29. Ghosn J. Dolutégravir : un nouvel inhibiteur de l'intégrase dans l'arsenal thérapeutique anti-VIH. Journal des Anti-infectieux. 1 oct 2015;17(3):111-4.
30. Y. Yazdanpanah. Les nouvelles molécules antirétrovirales. 2010.
31. Katlama C, Tubiana R, Murphy R. Les nouvelles molécules anti-VIH : la place du raltégravir.1 févr 2009;11(1):11-7.
32. USAID. Test and Start: Optimizing Antiretroviral Therapy Services to Save Lives. 2019. Disponible sur: <https://www.usaid.gov/global-health/health-areas/hiv-and-aids/technical-areas/test-and-start>
33. OMS. Ligne directrice unifiées relatives à l'utilisation de médicaments antirétroviraux pour le traitement et la prévention de l'infection à VIH. 2015.

34. World Health Organization. Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children: towards universal access: recommendations for a public health approach - 2010 révision. WorldHealthOrganization;2010.194p. Disponiblesur:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/164255>
35. Philippe M. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. 2014.
36. Laborde-Balen G, Taverne B, Ndour CT, Kouanfack C, Peeters M, Ndoye I. The fourth HIV epidemic. *The Lancet Infectious Diseases*. avr 2018;18(4):379-80.
37. Real F, Capron C, Sennepin A, Arrigucci R, Zhu A, Sannier G, et al. Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4<sup>+</sup> T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. *Sci Transl Med*. 18 mars 2020;12(535):eaat6263.
38. Laurent B. L'apparition de résistance à l'AZT et à la ddC au cours de leur association thérapeutique. 1994;2p.
39. Masquelier DB. Les bases de la résistance du VIH aux antirétroviraux. 2008;36.
40. Laurent B. Résistances aux antiviraux Les méthodes virologiques d'analyse de la sensibilité des souches virales. 2008. Disponible sur: [https://www.pistes.fr/transcriptases/47\\_413.htm](https://www.pistes.fr/transcriptases/47_413.htm)
41. Blanc A, Bonnet F. Résistance du VIH-1 aux antirétroviraux. 2016;15.
42. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, et al. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther*. 2005;10(7):791-802.
43. [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/13.Resistance du VIH aux antiretroviraux.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/13.Resistance_du_VIH_aux_antiretroviraux.pdf). 2017.
44. Clavel F. Résistance du VIH aux inhibiteurs de protéase : effets de la résistance sur la valeur répliquative (fitness) du virus, mécanismes compensateurs. 2000;4p.
45. HAS - Direction de l'Évaluation Médicale, Économique et de Santé Publique. 2018.
46. Tremblay. Les tests de détermination du tropisme viral du VIH-1. Québec: MSSS; 2012. 26 p.
47. Biblio expertise. Les différentes méthodes de mesure du tropisme. 2009;2.
48. Sophie C. Identification d'un nouveau rétrovirus VIH-1.1999. Disponible sur: [https://www.pistes.fr/transcriptases/72\\_1049.htm](https://www.pistes.fr/transcriptases/72_1049.htm)
49. Haute Autorité de Santé. Tests phénotypiques et tests génotypiques de détermination du tropisme du VIH-1 et traitement par antagoniste du récepteur CCR5. Avenue du Stade de France; 2009 p. 72.

50. <http://www.has-sante.fr>. Test génotypique de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase. 2010.
51. OMS. OMS recommande le dolutégravir comme option thérapeutique à privilégier contre le VIH dans toutes les populations. 2019.
52. Malet I, Delelis O, Valantin M-A, Montes B, Soulie C, Wirden M. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2008;52(4):1351-8.
53. Oumar Dolo et al. Résistance aux antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE. [Bamako]; 2014.
54. Fatoutamata A et al. Prévalence des échecs virologiques des adolescents infectés par le VIH-1 et sous traitement ARV [Thesis]. [Bamako]: USTTB; 2019.
55. Salou M et al. Taux élevés d'échec virologique et de résistance aux médicaments chez les enfants et les adolescents infectés par le VIH-1 pendant la période périnatale recevant un traitement antirétroviral à vie dans les cliniques de routine au Togo. *J Int AIDS Soc.* 2016;19(1):20683.
56. Diawara M et al. Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois. [Bamako]: USTTB; 2013.
57. Rodolphe Garraffo. La tolérance du ténofovir intéresse toujours les équipes médicales. [vih.org](http://vih.org). 2016. Disponible sur: <https://vih.org/20160225/la-tolerance-du-tenofovir-interesse-toujours-les-equipes-medicales/>
58. CRF02\_AG : un sous-type de VIH possiblement plus virulent. *Seronet*. 2019. Disponible sur: [https://seronet.info/billet\\_forum/un-sous-type-de-vih-possiblement-plus-virulent-de-plus-en-plus-frequent-en-france-84317](https://seronet.info/billet_forum/un-sous-type-de-vih-possiblement-plus-virulent-de-plus-en-plus-frequent-en-france-84317)
59. Imamichi H, Ousmane Koita. Identification and characterization of CRF02\_AG, CRF06\_cpx, and CRF09\_cpx recombinant subtypes in Mali, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses.* janv 2009;25(1):45-55.

## **Annexes**

### **FICHE SIGNALÉTIQUE :**

**Prénom :** Sory

**Nom :** Keita

**Nationalité :** Malienne

**Numéro de téléphone :** (+223) 77 08 07 15

**E-mail :** [soryk67@gmail.com](mailto:soryk67@gmail.com)

**Thème :** ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX CHEZ LES ENFANTS ET ADOLESCENTS DE PLUS DE 10 ANS SOUS TARV DANS LES 4 PAYS DU RESEAU EVA.

**Ville de Soutenance :** Bamako à la faculté de Médecine

**Pays d'origine :** Mali

**Dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie

**Secteur d'Intérêts :** virologie, microbiologie et infectiologie.

### **Résumé :**

L'accès aux antirétroviraux (ARV) pour le traitement des enfants infectés par le VIH dans ces pays s'est beaucoup amélioré. Alors que de plus en plus d'enfants sont mis sous traitement ARV, de nouveaux défis se présentent notamment l'efficacité des traitements et le risque d'échec aux traitements ARV dû soit à une mauvaise observance, ou à une concentration sérique insuffisante des médicaments et/ ou la préexistence de la résistance aux molécules à cause d'une exposition maternelle à ces molécules. Très peu de données sont disponibles sur le profil de résistance en cas d'échec virologique chez les enfants infectés par le VIH pourtant Essentiel pour le choix adéquat des molécules. Le but de notre étude était de mesurer la prévalence de la résistance aux antirétroviraux chez 28 patients au Mali, Cote d'Ivoire, Burkina et Sénégal infectés par le VIH-1 et en échec de leur traitement ARV incluant le TDF. Nous avons conduit une étude transversale prospective allant de la période de janvier 2018 à décembre 2020 chez des patients en échec virologique (charge viral  $\geq$  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 28 patients en échec virologique ( $CV \geq 1000$  copies/ml). Environ 64,3 % de nos patients était des hommes. L'âge médian était de 15.5 ans, 42,8% de CV comprise entre 10001 et 100000 copies/ml et la durée moyenne du traitement était de 64,74 mois. Les patients provenaient des centres d'excellence de prises en charge pédiatrique du réseau EVA des PV VIH Du Mali Burkina, Sénégal et la cote d'Ivoire. La majorité des patients était sous régime TDF+3TC/FTC+EFV, soit 67,74%. Le recombinant CRF02\_AG était le sous-type de VIH-1 le plus prédominant. Sur 28 patients inclus dans notre étude, nous avons enregistré 21 patients présentant de résistance aux ARV, soit une prévalence de 75 %. Ces données nous montrent qu'il est donc important de faire un test de génotypage avant tout traitement ARV et proposer un TARV la mieux adapter en tenant compte des recommandations national et international. Ceci permettra de prévenir l'émergence de la résistance chez ces enfants.

**Mots clés :** VIH-1, Résistance, ARV, réseau EVA

## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail ; je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraire. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception. Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure !**