

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi



Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie

Année Universitaire 2009/2010

N° 32



THESE

*Profil des mutations de résistance chez des patients infectés  
par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement  
antirétroviral de seconde ligne  
à Bamako au Mali*

Présentée et soutenue publiquement le --/--/10.... devant la Faculté de  
Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

**Mlle. Djeneba Bocar FOFANA**

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

JURY :

<b>PRESIDENT :</b>	<b>Pr. Flabou</b>	<b>BOUGOUDOGO</b>
<b>MEMBRES :</b>	<b>Pr. Hamar</b>	<b>Alassane TRAORE</b>
	<b>Dr. Ousmane</b>	<b>KOÏTA</b>
<b>CO-DIRECTEUR :</b>	<b>Dr. Almoustapha I. MAÏGA</b>	
<b>DIRECTEUR DE THESE :</b>	<b>Pr. Anatole</b>	<b>TOUNKARA</b>

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**  
**ANNEE UNIVERSITAIRE 2009 - 2010**

**ADMINISTRATION**

DOYEN : ANATOLE TOUNKARA - PROFESSEUR  
1<sup>er</sup> ASSESSEUR : DRISSA DIALLO - MAITRE DE CONFERENCES  
2<sup>ème</sup> ASSESSEUR : SEKOU SIDIBE - MAITRE DE CONFERENCES  
SECRETAIRE PRINCIPAL : YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - PROFESSEUR  
AGENT COMPTABLE : MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL - CONTROLEUR DES FINANCES

**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

Mr Alou BA	Ophthalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique
Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie
Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

**LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE**

**D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES**

**1. PROFESSEURS**

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie – Réanimation (en détachement)
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale, <b>Chef de D.E.R</b>
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

**2. MAITRES DE CONFERENCES**

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie. Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique (en détachement)
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale

Mr Sadio YENA  
Mr Youssouf COULIBALY  
Mr Zimogo Zié SANOGO  
Mr Mohamed KEITA

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA  
Mr Samba Karim TIMBO  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO  
Mme Diénéba DOUMBIA  
Mr Zanafon OUATTARA  
Mr Adama SANGARE  
Mr Sanoussi BAMANI  
Mr Doulaye SACKO  
Mr Ibrahim ALWATA  
Mr Lamine TRAORE  
Mr Mady MACALOU  
Mr Aly TEMBELY  
Mr Niani MOUNKORO  
Mr Tiemoko D. COULIBALY  
Mr Souleymane TOGORA  
Mr Bouraïma MAIGA  
Mr Youssouf SOW  
Mr Djibo Mahamane DIANGO  
Mr Moustapha TOURE  
Mr Mamadou DIARRA  
Mr Boubacary GUINDO  
Mr Moussa Abdoulaye OUATTARA  
Mr Birama TOGOLA  
Mr Bréhima COULIBALY  
Mr Adama Konoba KOITA  
Mr Adégné TOGO  
Mr Lassana KANTE  
Mr Mamby KEITA  
Mr Hamady TRAORE  
Mme KEITA Fatoumata SYLLA  
Mr Drissa KANIKOMO  
Mme Kadiatou SINGARE  
Mr Nouhoum DIANI  
Mr Aladji Seydou DEMBELE  
Mr Ibrahima TEGUETE  
Mr Youssouf TRAORE  
Mr Lamine Mamadou DIAKITE  
Mme Fadima Koréïssy TALL  
Mr Mohamed KEITA  
Mr Broulaye Massaoulé SAMAKE  
Mr Yacaria COULIBALY  
Mr Seydou TOGO  
Mr Tioukany THERA  
Mr Oumar DIALLO  
Mr Boubacar BA  
Mme Assiatou SIMAGA  
Mr Seydou BAKAYOKO  
Mr Sidi Mohamed COULIBALY  
Mr Japhet Pobanou THERA  
Mr Adama GUINDO  
Mme Fatimata KONANDJI  
Mr Hamidou Baba SACKO  
Mr Siaka SOUMAORO  
Mr Honoré Jean Gabriel BERTHE  
Mr Drissa TRAORE  
Mr Bakary Tientigui DEMBELE  
Mr Koniba KEITA  
Mr Sidiki KEITA  
Mr Soumaïla KEITA  
Mr Alhassane TRAORE

Chirurgie Thoracique  
Anesthésie – Réanimation  
Chirurgie Générale  
ORL

Gynéco-Obstétrique  
ORL  
ORL  
Anesthésie/Réanimation  
Urologie  
Orthopédie - Traumatologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie (en détachement)  
Orthopédie - Traumatologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie/Traumatologie  
Urologie  
Gynécologie/Obstétrique  
Odontologie  
Odontologie  
Gynéco/Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-réanimation  
Gynécologie  
Ophtalmologie  
ORL  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Pédiatrique  
Odonto-Stomatologie  
Ophtalmologie  
Neuro Chirurgie  
ORL-Rhino-Laryngologie  
Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Gynécologie/Obstétrique  
Gynécologie/Obstétrique  
Urologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Chirurgie Thoracique et Cardio Vasculaire  
Gynécologie  
Neurochirurgie  
Odontostomatologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
ORL  
ORL  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale

## D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA  
Mr Ogobara DOUMBO  
Mr Yénimégué Albert DEMBELE  
Mr Anatole TOUNKARA  
Mr Bakary M. CISSE  
Mr Abdourahmane S. MAIGA  
Mr Adama DIARRA  
Mr Mamadou KONE  
Mr Sékou F.M. TRAORE

Biologie  
Chimie Organique  
Parasitologie – Mycologie  
Chimie Organique  
Immunologie  
Biochimie  
Parasitologie  
Physiologie  
Physiologie  
Entomologie Médicale

### 2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Amadou TOURE  
Mr Flabou BOUGODOGO  
Mr Amagana DOLO  
Mr Mahamadou CISSE  
Mr Abdoulaye DABO  
Mr Ibrahim I. MAIGA  
Mr Mahamadou A. THERA  
Mr Moussa Issa DIARRA  
Mr Mouctar DIALLO  
Mr Djibril SANGARE  
Mr Boubacar TRAORE

Histoembryologie  
Bactériologie-Virologie  
Parasitologie **Chef de D.E.R.**  
Biologie  
Malacologie, Biologie Animale  
Bactériologie – Virologie  
Parasitologie -Mycologie  
Biophysique  
Biologie Parasitologie  
Entomologie Moléculaire Médicale  
Parasitologie Mycologie

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Lassana DOUMBIA  
Mr Mounirou BABY  
Mr Kaourou DOUCOURE  
Mr Bouréma KOURIBA  
Mr Souleymane DIALLO  
Mr Cheik Bougadari TRAORE  
Mr Guimogo DOLO  
Mr Abdoulaye TOURE

Chimie Organique  
Hématologie  
Biologie  
Immunologie  
Bactériologie-Virologie  
Anatomie-Pathologie  
Entomologie Moléculaire Médicale  
Entomologie Moléculaire Médicale

Mr Mahamadou DIAKITE  
Mr Bakarou KAMATE  
Mr Bakary MAIGA  
Mr Bokary Y. SACKO

Immunologie – Génétique  
Anatomie Pathologie  
Immunologie  
Biochimie

### 4. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOGO  
Mr Mamadou BA  
Mr Moussa FANE  
Mr Blaise DACKOUCO  
Mr Aldiouma GUINDO

Entomologie Moléculaire Médicale  
Biologie, Parasitologie Entomologie Médicale  
Parasitologie Entomologie  
Chimie Analytique  
Hématologie

## D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Mahamane MAIGA  
Mr Baba KOUMARE  
Mr Moussa TRAORE  
Mr Hamar A. TRAORE  
Mr Dapa Aly DIALLO  
Mr Moussa Y. MAIGA  
Mr Somita KEITA  
Mr Boubakar DIALLO  
Mr Toumani SIDIBE  
Mr Mamady KANE

Néphrologie  
Psychiatrie, **Chef de DER**  
Neurologie  
Médecine Interne  
Hématologie  
Gastro-entérologie – Hépatologie  
Dermato-Léprologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Radiologie

## 2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bah KEITA  
Mr Abdel Kader TRAORE  
Mr Siaka SIDIBE  
Mr Mamadou DEMBELE  
Mr Saharé FONGORO  
Mr Bakoroba COULIBALY  
Mr Bou DIAKITE  
Mr Bougouzié SANOGO  
Mme SIDIBE Assa TRAORE  
Mr Adama D. KEITA  
Mr Sounkalo DAO  
Mme TRAORE Mariam SYLLA  
Mr Daouda K. MINTA  
Mr Souleymane DIALLO

Pneumo-Phtisiologie (en détachement)  
Médecine Interne  
Radiologie  
Médecine Interne  
Néphrologie  
Psychiatrie  
Psychiatrie  
Gastro-entérologie  
Endocrinologie  
Radiologie  
Maladies Infectieuses  
Pédiatrie  
Maladies Infectieuses  
Pneumologie

## 3. MAITRES ASSISTANTS

Mme Habibatou DIAWARA  
Mr Kassoum SANOGO  
Mr Seydou DIAKITE  
Mr Arouna TOGORA  
Mme KAYA Assétou SOUCKO  
Mr Boubacar TOGO  
Mr Mahamadou TOURE  
Mr Idrissa A. CISSE  
Mr Mamadou B. DIARRA  
Mr Anselme KONATE  
Mr Moussa T. DIARRA  
Mr Souleymane COULIBALY  
Mr Cheick Oumar GUINTO  
Mr Mahamadoun GUINDO  
Mr Ousmane FAYE  
Mr Yacouba TOLOBA  
Mme Fatoumata DICKO  
Mr Boubacar DIALLO  
Mr Youssoufa Mamoudou MAIGA  
Mr Modibo SISSOKO  
Mr Ilo Bella DIALLO  
Mr Mahamadou DIALLO  
Mr Adama Agoussa DICKO  
Mr Abdoul Aziz DIAKITE  
Mr Boubacar dit Fassara SISSOKO  
Mr Salia COULIBALY  
Mr Ichaka MENTA  
Mr Souleymane COULIBALY

Dermatologie  
Cardiologie  
Cardiologie  
Psychiatrie  
Médecine Interne  
Pédiatrie  
Radiologie  
Dermatologie  
Cardiologie  
Hépatogastro-entérologie  
Hépatogastro-entérologie  
Psychologie  
Neurologie  
Radiologie  
Dermatologie  
Pneumo-Phtisiologie  
Pédiatrie  
Médecine Interne  
Neurologie  
Psychiatrie  
Cardiologie  
Radiologie  
Dermatologie  
Pédiatrie  
Pneumologie  
Radiologie  
Cardiologie  
Cardiologie

## D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 1. PROFESSEURS

Mr Gaoussou KANOUTE  
Mr Ousmane DOUMBIA  
Mr Elimane MARIKO

Chimie analytique, Chef de D.E.R.  
Pharmacie Chimique  
Pharmacologie

### 2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Drissa DIALLO  
Mr Alou KEITA  
Mr Benoît Yaranga KOUMARE  
Mr Ababacar I. MAIGA  
Mme Rokia SANOGO

Matières Médicales  
Galénique  
Chimie Analytique  
Toxicologie  
Pharmacognosie

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Yaya KANE	Galénique
Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Abdoulaye DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
Mr Sékou BAH	Pharmacologie
Loséni BENGALY	Pharmacie Hospitalière

### D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

#### 1. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
Mr Jean TESTA	Santé Publique
Mr Mamadou Soun calo TRAORE	Santé Publique, <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale

#### 2. MAITRES ASSISTANTS

Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Hammadoun Aly SANGO	Santé Publique
Mr Akory AG IKNANE	Santé Publique
Mr Ousmane LY	Santé Publique
Mr Cheick Oumar BAGAYOKO	Informatique Médecine
Mme Fanta SANGHO	Santé Communautaire

#### 3. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Seydou DIARRA	Anthropologie Médicale

### CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique (Ministre)
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souléymané GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Lassine SIDIBE	Chimie Organique
Mr Cheick O. DIAWARA	Bibliographie

### ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie
Pr. Lamine GAYE	Physiologie
Pr. Pascal BONNABRY	Pharmacie Hospitalière

DEDICACES

ET

REMERCIEMENTS

## DEDICACES

Je dédie ce travail :

**A mon père :** Feu BAKARY FOFANA

Cher papa, tu nous as quitté très tôt, mais la bonne image que tu as laissé derrière toi nous éclaire le chemin combien fastidieux de la vie. Ton esprit d'excellence dans le travail me donne la soif d'apprendre avec rigueur et persévérance.

Que ton âme repose en paix !

**A ma mère :** AMINATA DIOMBANA

Maman, les mots me manquent pour te remercier infiniment. En plus d'une mère, tu as été pour nous un père, une amie et une enseignante exemplaire et combien enviée de tous. Que Dieu te donne longue vie et plein de santé, merci d'être toujours à mes côtés, et je ne cesserai jamais de te dire «Maman, fait encore et toujours des bénédictions pour moi !».

**A mon oncle :** Feu OUMAR FOFANA

Tu nous as douloureusement quitté durant ce travail, cher oncle, sache que tu as bien occupé la place de père pour mes frères, et moi ! Dors en paix tonton OUMAR.

**A ma maman** KADIA DIABY

Merci pour tes bénédictions. A toi santé et longue vie !

**A mes frères et sœurs** FOFANA

Djenebou, Alpha, Almamy, Lamine, Kader, Alou, Ismaël, M'baye, Youssouf, Fatoumata Youma dite Tenin, Daouda, Moussa et Coumba dite Gogo.

Cultivons toujours ensemble l'esprit de famille, et restons unis, comme papa et nos mamans l'ont toujours voulu.

**A neveux et nièces**

Trouvez dans ce travail un repère, sachez que le monde actuel nous oblige à nous battre sur tous les fronts ! Que Dieu vous donne longue vie mes chéris(e) et courage !

**A ma tante** ABSSETOU DIOMBANA

Merci pour ton soutien et tes bénédictions, que Dieu te donne longue vie.



## REMERCIEMENTS

*A Allah le Tout-Puissant, le Très Miséricordieux et au Prophète Mohamed (PSL).*

Pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail qui me tenait tant à cœur. Gloire à toi Allah, car nul ne peut se passer de ton aide !

A tout le corps professoral de la FMPOS : Ce travail est avant tout le vôtre.

A mon oncle Pr. Mamadou L Diombana

Au Dr Almoustapha Maiga

Au Dr Mamadou I Kampo

A mon tonton Boubacar Sidiki Traoré et famille

A mes oncles et tantes :

Daouda, Mantar, Almamy Traoré, Kadidia, Fadel, Malado, Manè...

Vous m'avez apporté un grand soutien moral et matériel durant ces longues années d'études

A mes cousins(e) des familles FOFANA, DIOMBANA, KAMPO, TRAORE, BALLO, DIANKA...

A mes camarades de promotion « **PHARMAHOME** » du Pr. Dolo.A et Pr. Rokia Sanogo

Aux Dr Kodio Joseph, Dr Antoine Dara,

A tout le personnel du SEREFO

Au Club des bons amis, Promotion LMAS 2003

**A l'AMERS**

**A l'AEP et FESPAO**

A candlelight, Villa Rouge, famille Coulibaly au point G

Au Dr Traoré Moussa dit Pré et tous les Pairs éducateurs du Mali

Au Dr Maiga Zainaba de la « Pharmacie du 26 Mars »

Au Dr Koné Issa « Pharmacie BALAZAN » à Ségou

A toutes les personnes vivant avec le VIH.

A tous ceux dont j'ai omis le nom ici.

*Je vous remercie pour la bonne collaboration et le soutien. Ce travail est le votre.*

HOMMAGES

AUX

MEMBRES

DU JURY

## A notre maître et président du jury

- Professeur Flabou Bougoudogo
- Maître de conférences agrégé en bactériologie et virologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé Public (INRSP)
- Chevalier de l'ordre du mérite de la santé

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse malgré vos multiples occupations.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements tout au long de notre cursus.

Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rigoureux, appliqué et attaché au travail bien fait.

Recevez ici cher maître nos sincères remerciements, et notre plus grand respect.

## A notre maître et juge

- Professeur Hamar Alassane Traoré
- Professeur titulaire de médecine interne à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- Chef de service de médecine interne au CHU de l'hôpital du point G
- Responsable des cours de sémiologie et de thérapeutique à la FMPOS
- Président de la commission scientifique de lutte contre le VIH et le SIDA

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos responsabilités et occupations multiples.

L'immensité de vos connaissances scientifiques, votre rigueur dans le travail, votre humilité, votre tempérament calme et votre amabilité font de vous un maître admiré et respecté de tous.

Cher maître, veuillez recevoir à travers ces mots, l'expression de notre profonde reconnaissance.

## A notre maître et juge

- Dr Ousmane Koïta
- Docteur en pharmacie et PhD en parasitologie Moléculaire
- Chargé de cours de biologie moléculaire à la FAST et de biologie Animale à la FMPOS
- Responsable du laboratoire de biologie moléculaire Appliquée de la FAST
- Directeur Adjoint du programme NIH/NIAID/FMPOS de recherche sur le SIDA et la Tuberculose

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Vous êtes un innovateur de la biologie moléculaire au Mali. Nous vous avons rencontré à la faveur de ce travail, nous avons été marqués par votre amabilité, et votre sens du travail bien fait. Nous gardons de vous l'image d'un homme de science rempli d'esprit de recherche.

Cher maître trouvez ici notre profonde reconnaissance.

## A notre maître et co-directeur

- Dr Almoustapha I. Maïga
- Docteur en pharmacie et doctorant en Virologie à l'Ecole de doctorale Complexité du Vivant (CdV) de l'Université Pierre et Marie UPMC « Paris 6 » à Paris. Etudiant-chercheur au laboratoire de virologie à la Pitié-Salpêtrière à Paris.
- Responsable de l'unité épidémiologique sur la résistance aux antirétroviraux au SEREFO

Cher maître, malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de co-diriger ce travail.

Permettez-nous de vous remercier cher Maître de la confiance que vous nous avez faite en nous confiant ce travail.

Plus qu'un co-directeur, vous avez fait de ce travail le vôtre. Vous nous avez guidé, encouragé et conseillé tout au long de ce travail. Vous avez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Veillez accepter cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude.

## A notre Maître et Directeur de thèse

- Professeur Anatole Tounkara
- Professeur titulaire d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- Directeur du programme NHI/NIAID/FMPOS de recherche sur le SIDA et la Tuberculose
- Doyen de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako

Cher Maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant diriger ce travail.

Permettez nous de vous remercier cher Maître, pour la confiance que vous nous avez faite en nous acceptant dans votre centre.

Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rigoureux, appliqué et attaché au travail bien fait. Tout au long de cette étude, nous avons été permanemment animés par le souci de produire un travail à la hauteur de vos attentes. Malgré vos multiples occupations vous avez été disponible pour nous tout au long de ce travail.

Cher maître, vous resterez pour nous une référence et un bel exemple à suivre.

Recevez ici cher maître, nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

# SOMMAIRE



## Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Objectifs.....	4
2.1. Objectifs général.....	4
2.2. Objectifs spécifiques.....	4
3. Généralités.....	5
3.1. Généralités sur l'infection à VIH et sida.....	5
3.1.1. Définition et historique de découverte du VIH/SIDA.....	5
3.1.2. Epidémiologie.....	6
3.2. Rétrovirus.....	9
3.2.1. Définition.....	9
3.2.2. Caractéristiques.....	9
3.2.3. Virus de l'Immunodéficience Humaine.....	10
3.3. Répartition géographique.....	15
3.4. Cellules cibles des virus VIH.....	17
3.5. Cycle de réplication du VIH.....	17
3.6. Effets cytopathique du VIH.....	18
3.7. Histoire naturelle de la maladie.....	19
3.8. Classification en stades cliniques.....	19
3.9. Diagnostic au laboratoire.....	20
3.9.1. Diagnostic indirect.....	21
3.9.2. Outils bioinformatique d'analyse des séquences D'ADN.....	25
3.10. Généralités sur le traitement et les résistances aux ARV.....	26
3.10.1. Traitement.....	26
3.10.2. Résistance du VIH-1 aux ARV.....	34
4. Méthodologie.....	48
4.1. Cadre d'étude.....	48
4.2. Type et période de l'étude.....	48
4.3. Population d'étude.....	49
4.4. Critères d'inclusion.....	49
4.5. Critères de non inclusion.....	49
4.6. Technique utilisée.....	49

4.6.1. Principe de la technique Viroseq® .....	50
4.6.2. Réactifs et matériel .....	50
4.6.2. Procédure de la technique : .....	52
5. Résultats .....	60
6. Commentaires et discussion .....	74
6.1. Limites de notre étude .....	74
6.2. La technique utilisée .....	76
6.3. Données démographiques et biologiques .....	79
6.4. Prévalence des mutations de résistance aux ARV .....	79
6.4.1. Prévalence de mutations de résistance aux INTI .....	80
6.4.2. Prévalence de mutations de résistance aux INNTI .....	80
6.4.3. Prévalence des mutations de résistance aux IP .....	81
6.5. Diversité Génétique et sous-type VIH .....	81
6.6. Prévalence de mutations selon le sous type .....	82
7. Conclusion .....	84
8. Recommandations .....	85
9. Références bibliographiques .....	86

## Liste des tableaux

<b>Tableaux I</b> : Epidémiologie du VIH dans le monde et en Afrique Subsaharienne.....	7
<b>Tableaux II</b> : La répartition du VIH au Mali par région en 2006.....	8
<b>Tableaux III</b> : Molécules antirétrovirales disponibles avec une autorisation de mise sur le marché ou non en 2009.....	28
<b>Tableaux IV</b> : Réactifs et quantités utilisées.....	53
<b>Tableaux V</b> : Protocole d'amplification .....	54
<b>Tableaux VI</b> : Réactifs et quantités utilisées.....	55
<b>Tableaux VII</b> : Protocole d'amplification de la PCR.....	57
<b>Tableaux VIII</b> : Protocole d'amplification de la réaction de séquences .....	57
<b>Tableaux IX</b> : Répartition des patients en fonction de l'âge.....	57
<b>Tableaux X</b> : Répartition des patients en fonction en fonction du service demandeur .....	61
<b>Tableaux XI</b> : Répartition des patients en fonction du taux de lymphocyte T CD4+.....	61
<b>Tableaux XII</b> : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique (CVp) en copie /ml.....	62
<b>Tableaux XIII</b> : Répartition des patients en fonction des traitements antirétroviraux de 1 <sup>ère</sup> ligne.....	63
<b>Tableaux XIV</b> : Répartition des patients en fonction des traitements antirétroviraux de 2 <sup>ème</sup> ligne.....	63
<b>Tableaux XV</b> : Répartition des patients en fonction des mutations de résistances aux traitements antirétroviraux chez les 43 patients séquences .....	66
<b>Tableaux XVI</b> : Répartition des mutations associées aux INTI en fonction des sous types...70	
<b>Tableaux XVII</b> : Répartition des mutations associées aux INNTI en fonction des sous types.....	71
<b>Tableaux XVIII</b> : Répartition des mutations associées aux IP en fonction des sous types.....	72

## Liste des figures

Figure 1 : Structure morphologique du VIH-1 [12].....	10
Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH-1[12] .....	11
Figure 3: Mécanisme de la recombinaison génétique.[59] .....	14
Figure 4: 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 .....	16
Figure 5 : <i>Schéma du cycle réplcatif du VIH</i> [20] .....	17
Figure 6: Principe de la PCR.....	22
Figure 7: Principe du séquençage de l'ADN .....	25
Figure 8 : Mode d'action des INTI .....	36
Figure 9: mutation sur la RT empêche l'attachement de l'AZT [35] .....	37
Figure 10: Résistance par excision des analogues nucléosidiques [35].....	38
Figure 11 : Mécanisme d'action et de résistance des INNTI [35] .....	39
Figure 12: Mécanisme d'action des IP [35] .....	41
Figure 13 : Les mutations dans la protéase réduit l'affinité et l'effet des IP [35] .....	41
Figure 14 Fusion peplomer du VIH à la membrane de la cellule hôte [35].....	43
Figure 15 : T-20 lié au peplomer du vih et bloque son mouvement [35] .....	44
Figure 16 : Photo de gel .....	56
Figure 17 : Exemple d'alignement des séquences nucléotiques .....	58
Figure 18 Schéma de la méthodologie du génotypage ! .....	59
Figure 19 Répartition des patients en fonction du sexe .....	60
Figure 20: Répartition des patients en fonction du sous-type VIH-1 .....	65
Figure 21 : Fréquence des mutations associées aux INTI.....	67
Figure 22: Fréquence des mutations associées aux INNTI.....	68
Figure 23: Fréquence des mutations associées aux IP. ....	69

# ABBREVIATIONS

## Abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARV** : Antirétroviraux

**CD** : Cluster of Différenciation

**CDC**: Centers of Diseases Control and prevention

**CCR5**: CC Chemokine Receptor 5

**CVp**: Charge virale plasmatique

**CRF**: Circulating recombinant form

**CXCR4**: CXC Chemokine Receptor 4

**ddNTP**: di-désoxy Nucléotide Triphosphate

**dNTP**: di- Nucléotide Triphosphate

**ELISA**: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**Env**: Enveloppe

**Gag** : Group antigen ou antigène de group

**gp** : glycoprotéine

**IP** : Inhibiteur de la Protéase

**IMAARV** : Initiative malienne d'accès aux antiretroviraux

**INNRT** : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Reverse Transcriptase

**INRT** : Inhibiteur Nucléosidique de la Reverse Transcriptase

**ISBS** : Integrated Sexually transmitted diseases prevalence and Behavioral survey in Mali (Enquête intégrée sur la prévalence et les comportements en matière d'IST)

**LTR**: Long Terminal Repeat

**PEC:** Prise en charge

**PV VIH:** Personnes vivant avec le virus immunodéficience humain

**SIV :** Simian Immunodeficiency Virus

**TBE :** Tris Borate EDTA

**URF :** Unique recombinant form

**UV :** Ultra Violet

### **Abréviation des ARV**

**AZT** = zidovudine

**SQV** = saquinavir

**DDI** = didanosine

**IDV** = indinavir

**FTC** = emtricitabine

**LPV** = lopinavir

**3TC** = lamivudine

**TPV** = tipranavir

**D4T** = stavudine

**DRV** = darunavir

**ABC** = abacavir

**APV** = amprénavir

**TDF** = tenofovir

**ATV** = atazanavir

**NVP** = nevirapine

**EFV** = efavirenz

**ETV** = étravirine

### **Abréviations 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.

# INTRODUCTION



## 1. Introduction

Vingt sept ans après sa découverte, le virus de l'immunodéficience humaine causant le syndrome d' l'immunodéficience acquise (VIH/SIDA) reste un problème de santé publique au monde d'une portée sans précédent. Il figure parmi les causes premières de mortalité dans le monde [1].

La stabilité récente de l'épidémie ne peut masquer son principal aspect, son énorme tribut humain. Ainsi, l'organisation des nations unies contre le SIDA (ONUSIDA) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) indique dans leur rapport annuel 2009, qu'en 2008, 33,4 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde, avec 2,7 millions de nouvelles infections. Parallèlement le nombre de décès dû au SIDA a décliné au cours des trois dernières années, passant de 2,2 millions en 2005 à 2 millions en 2008[1].

Les femmes représentent la moitié de toutes les personnes vivant avec le VIH dans le monde. L'Afrique subsaharienne, reste la région la plus fortement touchée avec 1,9 million de personnes nouvellement infectées, ce qui porte à 22,4 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH soit deux tiers, 67% du total mondial. Trois quart, 75% de tous les décès dus au SIDA y sont survenus[2].

L'accès au traitement s'étant accru au cours des cinq dernières années, le nombre annuel des décès dus au sida a chuté de 10% [1]. L'avènement en 1996 de la HAART (*High Active Antirétroviral Therapy*), en français thérapie antirétrovirale fortement active, comprenant les molécules antirétrovirales, telles que les inhibiteurs de protéase, a permis d'atteindre l'objectif du traitement antirétroviral. Cet objectif est de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées au SIDA en ralentissant la réplication du VIH de tel point que la charge virale plasmatique dans le sang baisse en dessous des seuils de détection des automates d'analyse (< 50 copies/ml)[3]. Malgré les efforts considérables, il existe de nos jours, une disparité dans l'accès aux traitements entre les pays industrialisés et les pays à ressources limitées. Ces derniers n'ont eu accès aux antirétroviraux (ARV) que très tardivement. Dans ces pays, il existe une mauvaise connaissance de ces ARV. Les interruptions d'approvisionnement en ARV surviennent et peuvent conduire à des phénomènes de résistance. Il y a aussi les problèmes d'observance.

Au Mali, la quatrième enquête démographique de santé (EDS M-IV), réalisée en 2006 a montré une baisse du taux de prévalence de 1,7% à 1,3% avec une séroprévalence élevée du VIH-1.

Le vaccin contre le VIH n'étant pas disponible pour le moment, la thérapie antirétrovirale bien conduite reste l'arme de choix.

Au Mali, l'utilisation des ARVs à large spectre a vu le jour en novembre 2001 à travers une politique nationale dénommée « Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux » IMAARV. La gratuité du traitement a été possible par un décret présidentiel en date du 14 juillet 2004 [4]. Cette gratuité a considérablement élargi l'accès aux traitements ARVs avec la recommandation d'une combinaison d'au moins trois molécules.

En septembre 2009, grâce à la mobilisation de partenaires et acteurs de lutte contre le sida, 27333 patients étaient sous traitement ARV au Mali. Les traitements étaient disponibles dans les 8 régions et dans le district de Bamako.

Cependant, il est important de tenir compte de l'expérience des pays du Nord sur la question de la résistance aux traitements, qui est un point clé dans la prise en charge des patients infectés par le VIH. Dans notre contexte, l'accès aux traitements ARV est devenu rationnel à cause de sa gratuité depuis 2004.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des médicaments de premières lignes dans les premières années de traitement. Cependant une proportion de patients sous traitements ARV peuvent développer des résistances à une ou à plusieurs molécules dans les schémas thérapeutiques de secondes lignes avec une émergence des mutations [35]. Si les travaux antérieurs ont démontré l'efficacité des médicaments de premières lignes, il n'en demeure pas moins que des résistances surviennent au cours du traitement avec plusieurs molécules. Au Mali quel est le profil de mutation des virus résistants à la seconde ligne de traitement ? Les seules données dont nous disposons à propos de résistance concernent les échecs précoces du traitement (Marcelin et al, 2007 ; Sylla et al, 2008). Mais nous ne disposons pas de profils de mutation du VIH-1 des patients ayant développé un échec thérapeutique de seconde ligne.

*Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.*

Notre objectif principal est d'étudier le profil des mutations responsables de résistance aux ARV chez des patients infectés par le VIH-1, traités et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne.

# OBJECTIFS

### 3. Généralités

#### 3.1. Généralités sur l'infection à VIH et sida

##### 3.1.1. Définition et historique de découverte du VIH/SIDA

Le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) est la maladie provoquée par un des virus de l'immunodépression humaine, le VIH-1 et/ou le VIH-2. L'existence d'un problème sanitaire est avérée en juillet 1981 lorsque le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) d'Atlanta relève une fréquence anormalement élevée de sarcome de kaposi, en particulier chez des homosexuels. L'apparition d'un nouveau virus est donc évoquée dès 1982. La première définition de l'infection à VIH/SIDA fut établie en 1982 par le CDC [7]. Elle reprenait en grande partie les manifestations observées chez les premiers patients d'une part et les observations rapportées au cours d'affections en relation avec ce nouveau phénomène d'autre part, bien que beaucoup de définition aient été donné au VIH/SIDA selon les régions du monde.

Le VIH serait simien selon la théorie la plus communément admise par la communauté scientifique, basée sur l'analyse phylogénétique des lentivirus qui lie les deux types de VIH (VIH-1 et VIH-2) avec le virus d'immunodéficience simien VIS, qui est également la cause chez les singes d'un syndrome d'immunodéficience comme le SIDA chez l'homme[2].

Cependant, les deux types de VIH sont assez éloignés l'un de l'autre ; et alors que le VIH-1 est proche du VIScpz (infectant une sous espèce des chimpanzés dits *Pan troglodyte*). Le VIH-2 est plus proche de VISmm (infectant les mangabeys enfumés) et des VISmac (infectant les macaques)[3] . Le VIH serait donc issu de deux introductions séparées, une pour le VIH-1 et une autre pour le VIH-2 [4]. C'est pourquoi, l'infection par le VIH doit être considérée comme une zoonose au même titre que d'autres maladies virales.

En 1983, l'équipe du professeur Jean Claud Chermann (avec Françoise Barre-sinoussi) de l'Institut Pasteur, sous la direction de Luc Montagnier, découvre et isole le VIH, la première

description du virus responsable du Sida, que l'équipe de l'Institut Pasteur avait appelé à l'époque "*Lymphadenopathy Associated Virus*" ou LAV [6].

En 1985, alors que les premiers tests de dépistage étaient disponibles, des réactions sérologiques atypiques ont été identifiées à partir du sérum de femmes sénégalaises, aboutissant à la mise en évidence d'un nouveau virus responsable également d'une immunodéficience, la LAV-2 ou HTLV-IV [35]. En 1986, la communauté scientifique s'accorde pour dénommer ces deux virus VIH-1 et VIH-2.

### **3.1.2. Epidémiologie**

Dès le début du 21<sup>e</sup> siècle, le sida s'est transformé en une pandémie. Il y a eu entre 1981 et 2006 environ 25 millions de morts dues aux maladies en rapport avec le sida [8]. En 2008, l'épidémie semble marquer le pas, le nombre de séropositifs ayant sensiblement diminué de 38,6 millions en 2006 à 33,4 millions de personnes séropositives en 2008 [5].

Selon les dernières estimations fournies par le rapport ONUSIDA 2009 : en 2008, il y a eu 2,7 millions de nouvelles infections liées au VIH, et 2 millions de décès liés au Sida, cependant l'Afrique subsaharienne reste la région la plus fortement touchée avec 22,4 millions de personnes vivant avec le VIH et 1,4 million de décès. L'accès au traitement s'étant accru au cours des cinq dernières années, le nombre annuel des décès dus au Sida a chuté de 10% [1].

A l'échelle mondiale, le pourcentage de femmes parmi les personnes vivant avec le VIH est resté stable (à 52%), même si la proportion des infections chez les femmes augmente dans plusieurs pays.

**Tableau I : Epidémiologie du VIH dans le monde et en Afrique subsaharienne [1]**

Région	Nouvelles infections en 2008 en million	Personnes vivant avec le VIH fin 2008	Décès dus au sida durant 2008
Monde	2.7 (2.4-3.0) Adultes : 2.3 (2.0-2.5) Enfants ≤ 15 ans 430 000(240000-610000)	33.4 (31.1-35.8) Adultes 31.3 (29.2-33.7) Femmes 15.7 (14.2-17.2) Enfants ≤ 15 ans 2.1 (1.2-2.9)	2,0 (1.7-2.4) Adultes 1.7 (1.4-2,1) Enfants ≤ 15 ans 280000(150 000-410 000)
Afrique subsaharienne	1 900 000	22 400 000	1 400 000

Au Mali, les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2006 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographique et Santé (EDS M-IV), ont montré une baisse du taux de prévalence du sida de 1,7% à 1,3% faisant du Mali un pays à faible prévalence. Globalement, les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,5% et 1%). 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 [9].

L'évolution de la séroprévalence chez les groupes à risque selon l'enquête ISBS<sup>1</sup> 2006 montre une situation toujours préoccupante [10].

- Chez les professionnelles du sexe : 35,3 %
- Chez les routiers : 2,5%
- Chez les « coxeurs » (revendeurs de billets qui accompagnent les routiers) : 2,2%
- Chez les vendeuses ambulantes : 5,9%
- Chez les aides familiales: 2,2%

**Tableau II : la répartition du VIH au Mali par région en 2006 [10]**

Régions	Prévalence en %
Bamako	2.0
Mopti	1.6
Ségou	1.5
Sikasso	0.7
Kayes	0.7
Tombouctou	0.7
Kidal	0.2

#### **Mode de transmission**

Chez le sujet infecté, le VIH est présent dans la plupart des liquides biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), sperme, sécrétions vaginales, lait maternel). Trois principaux modes de transmission sont actuellement responsables de l'extension de l'épidémie :

- La transmission par voie sexuelle, la plus prédominante,
- La transmission verticale (de la mère à l'enfant).
- La transmission par voie sanguine.



### 3.2. Rétrovirus

#### 3.2.1. Définition

Ce sont des virus à ARN monocaténaire, de polarité positive, infectant les vertébrés. Ils se distinguent notamment par la présence d'une enzyme virale : la transcriptase inverse (TI, voire aussi RT pour *reverse transcriptase*) qui rétro transcrit leur génome d'ARN en ADN pour être intégré par la suite dans le génome de la cellule.

Selon les critères de pathogénicité et de phylogénie, on distingue trois sous familles :

- Oncovirus : ce sont des virus tumoraux à ARN, on retrouve parmi ceux-ci les virus humains HTLV-1, HTLV-2, le virus aviaire de Sarcome de Rous et les virus de la leucémie féline et murine.
- Lentivirus : ce sont des virus à génome plus complexes, qui provoquent des infections à évolution lente, on retrouve parmi ceux-ci les VIH (1 et 2).
- Spumavirus : sont des virus identifiés chez de nombreux mammifères. Ils ne sont associés à aucune pathologie humaine ou animale [11].

#### 3.2.2. Caractéristiques

Tous les rétrovirus possèdent trois gènes majeurs qui codent pour les polyprotéines : les gènes *gag*, *pol*, et *env*. Tous ces virus ont également deux gènes de régulation de la réplication en commun, *tat* et *rev*. Le génome viral possède à chaque extrémité (5' et 3') une même séquence répétitive de taille variable dite LTR (*Long Terminal Repeat*) permettant l'intégration stable du génome viral dans l'ADN de la cellule cible [12]. Cependant, les lentivirus ont quatre gènes auxiliaires : *nef*, *vif*, *vpr* et *vpx*.

Les protéines produites par ces gènes semblent avoir une influence sur le taux de réplication et la virulence virale.

### 3.2.3. Virus de l'immunodéficience humaine

Les VIH sont des lentivirus du groupe des rétrovirus avec tropisme pour les lymphocytes T CD4+, les monocytes/macrophages et les cellules microgliales. Ils sont enveloppés, de 90-120nm de diamètre, le core est un génome diploïde (deux copies identiques d'ARN monocaténaire), contient des enzymes virales comme la transcriptase inverse, l'endonucléase ou intégrase et la protéase. La sortie de la cellule au niveau du cytoplasme se fait par bourgeonnement.

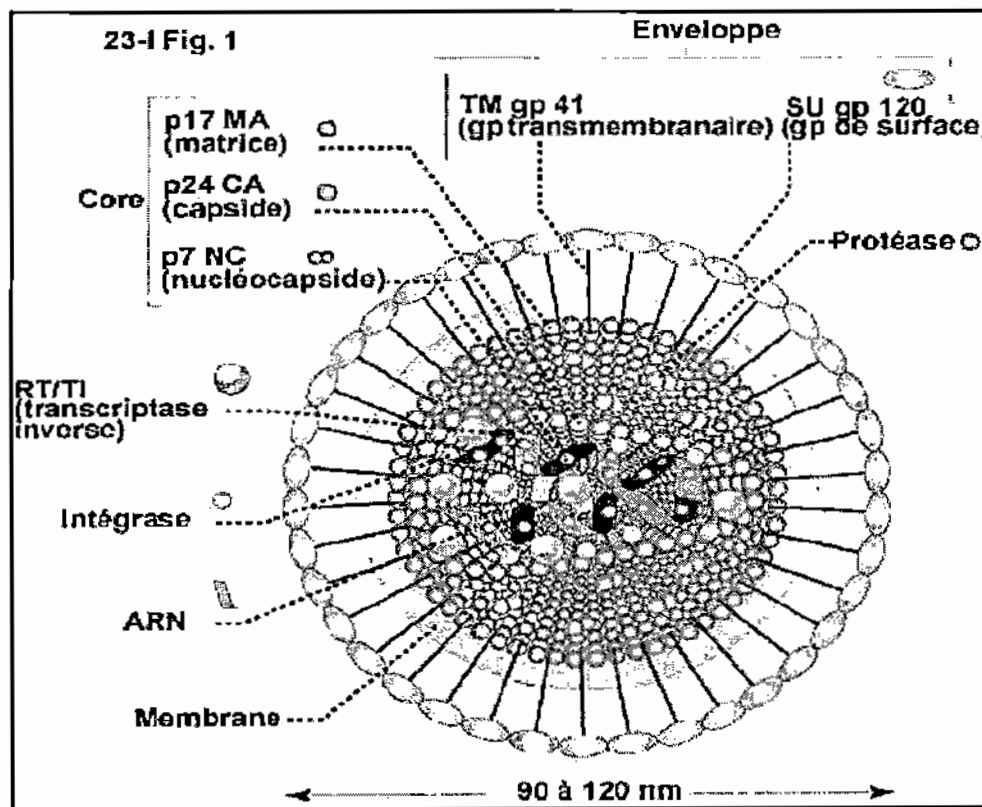


Figure 1 : Structure morphologique du VIH-1 [12]

#### 3.2.3.1. Morphologie du VIH-1 [12]

L'étude de la structure génétique du VIH-1 permet de comprendre la complexité de ce virus, certaines de ses manifestations cliniques et biologiques et d'envisager des stratégies pour la recherche thérapeutique.

Le génome du VIH consiste en un peu moins de 9700 nucléotides et est par conséquent 100 000 fois plus petit que le génome humain. Il comporte trois gènes principaux gag, pol, et env, six gènes accessoires vif, nef, vpr, tat, rev et vpu. A chaque extrémité du génome se trouve des séquences répétées LTR.

- Le gène gag (groupe des antigènes) synthétise un précurseur intracellulaire de 55kDa qui sera clivé par une enzyme pour donner :

P24 (PM 24000), protéine majeure de la capside

P17 (PM 17000), phosphoprotéine N-terminal, protéine de la matrice

P15 (PM 15000), nucléoprotéine N-terminal

- Le gène pol code pour les trois enzymes :

La Protéase indispensable au clivage du précurseur gag p55

La Transcriptase inverse (TI) sous deux formes moléculaires p64 et p53

L'endonuclease/intégrase p34.

- Le gène env. (enveloppe) synthétise un précurseur glycosylé intracellulaire de 160kDa qui sera clivé par d'autres enzymes pour donner :

GPSU gp120 (superficielle)

GPTM gp41 (transmembranaire).

Les LTRs (*Long Terminal Repeats*), sont des longues répétitions terminales des régions qui se trouvent à chaque extrémité du génome du VIH. Elles sont essentielles pour l'intégration du provirus dans un chromosome hôte.

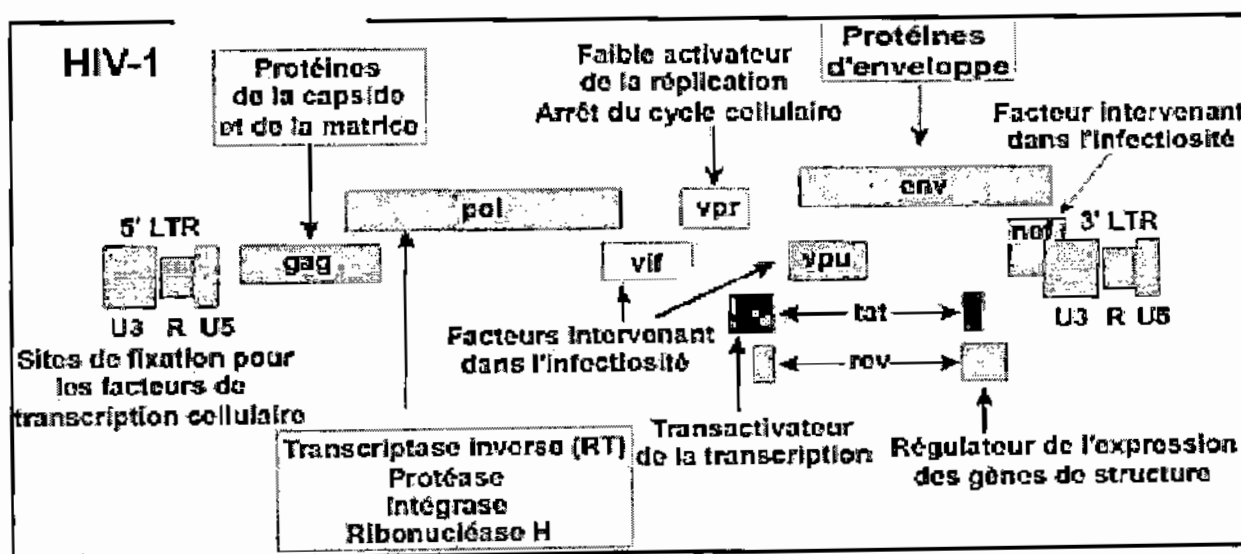


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH-1[12]

### 3.2.3.2. Stabilité physico-chimique du VIH-1

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

### 3.2.3.3. Diversité génétique du VIH-1

Dès 1985, une variabilité génétique importante a été mise en évidence. La diversité génétique du VIH-1, est l'une des caractéristiques de cette sous famille des virus. L'organisation génétique des VIH-1, VIH-2 et les SIV est similaire. Cependant, l'analyse phylogénétique comparative précise de chaque élément génétique de ces virus a montré une variation génétique entre les deux virus humains, qui est prédominante dans certaines régions du génome viral tels les gènes *env*. (surtout du domaine V3 de l'enveloppe du VIH-1, qui possède d'importantes fonctions biologiques et immunologiques). Sur la base des distances génétiques entre les VIH-1 retrouvés chez les patients, une classification des VIH-1 en trois groupes distincts appelés M, O et N a été établi [14]. Très récemment, un quatrième groupe appelé P différent des trois autres vient d'être découvert par les chercheurs Français [15] .

Le groupe M (Majoritaire), regroupe à présent neuf sous types (A, B, C, D, F, G, H, J, K), des sous types de A (A1, A2, A3 et A4), deux sous types F (F1, F2), certains dits <<purs>>, d'autres recombinants, mosaïques de différents sous types. Certains virus mosaïques jouent un rôle majeur dans l'épidémie mondiale du SIDA, d'où leur appellation de << Circulating Recombinants Forms >> ou CRFs. Actuellement, plus de quarante CRFs ont été identifié, (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>)[16], et plus de 200 formes recombinantes ne correspondant pas à ces critères de classification, appelées « *unique recombinant forms* » (URF) ont également été identifié à ce jour.

Le Groupe O (outlier), identifié au Cameroun et au Gabon est beaucoup plus rare. Il ne représente qu'une minorité de souches circulantes. Il regroupe un nombre limité de variants très éloignés de M qui présenteraient près de 50 % de divergence avec les autres VIH-1. L'épicentre de cette forme semble être le Cameroun où il représente 2 à 3 % des VIH-1 [17].

Le groupe N (non M et non O), a été aussi identifié au Cameroun. Les liens phylogénétiques récemment établis entre les virus N et des SIV des chimpanzés indiquent que des événements d'antropozoonose pourraient être à l'origine de l'infection VIH-1. En revanche, dans le gène *pol*, le VIH-1 du groupe N est proche du VIH-1 du groupe M [14]. De même, les VIH-2 sont également classés en huit sous types distincts [8], jusqu'à présent (A, B, C, D, E, F, G, et H).

L'un des obstacles au développement d'un vaccin efficace est représenté par ce phénomène de variabilité, qui a une conséquence sur la physiopathologie de la maladie et sur la prise en charge thérapeutique des patients infectés par le VIH-1 de sous type non-B.

#### **3.2.3.3.1. 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 commets un taux d'erreur d'environ 1 par cycle, soit une erreur introduite par cycle.
- **Cycle de réplication**

Le haut niveau de la réplication virale du VIH (estimé à  $10^9$ - $10^{10}$  virus produits par jour chez un individu infecté) induit une variabilité de la population virale au sein même de l'individu appelé quasi-espèce, à cause de la faible fiabilité de la TI.

- **Recombinaison génétique**

La production de virus recombinants nécessite deux cycles viraux successifs. Lors du 1<sup>er</sup> cycle viral, deux virus différents infectent une même cellule, 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 [5].

Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.

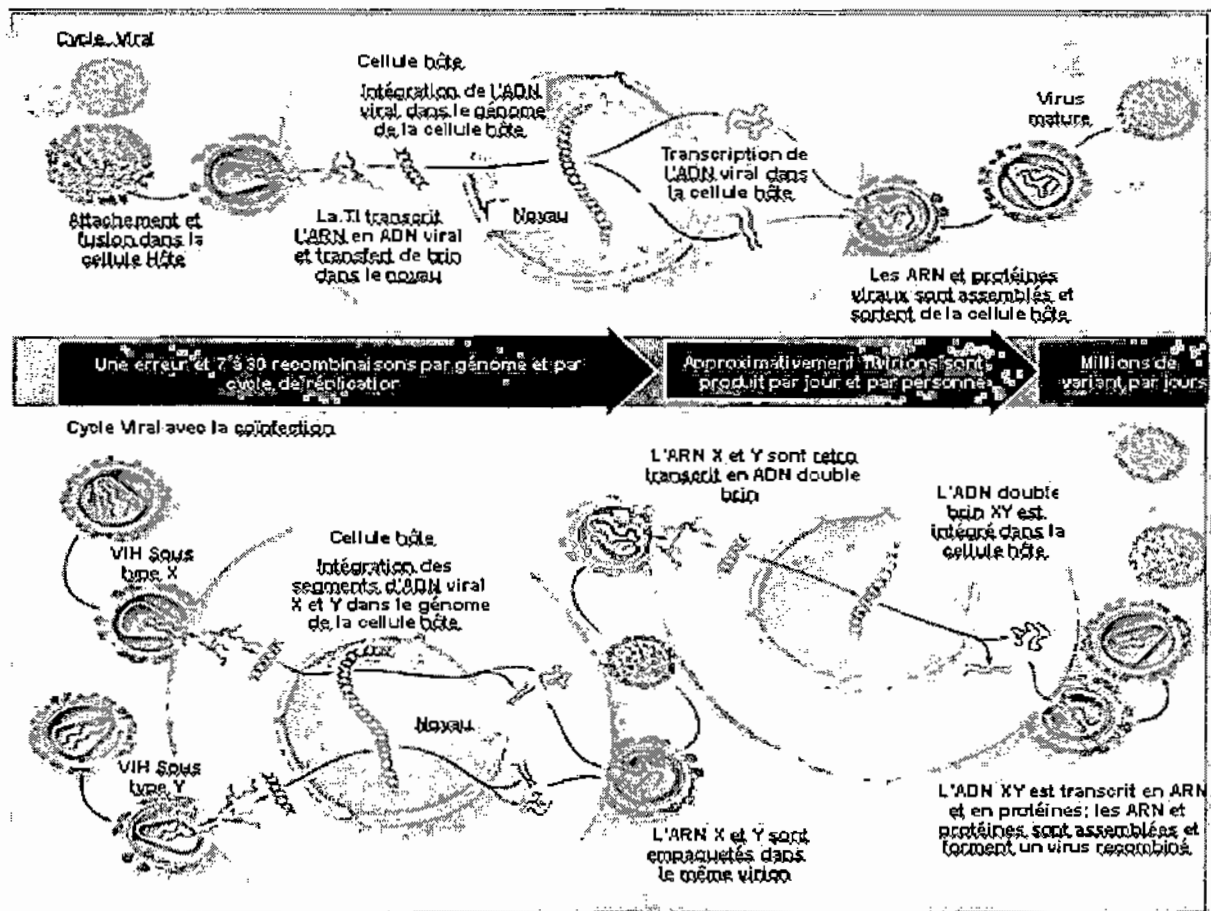


Figure 3: Mécanisme de la recombinaison génétique.[59]

### 3.2.3.3.2. Conséquences de la diversité génétique [18]

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de la réplication virale 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 (sérologie, 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 peuvent avoir une sensibilité moindre vis-à-vis des autres sous-types du groupe M appelé non-B.
- Certaines études laissent entendre que la résistance aux antirétroviraux varierait selon les sous-types. Par exemple, le groupe O du VIH-1 pourrait présenter une sensibilité réduite aux inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse. Des études ont démontré que plus de 50% des virus non-B infectant des patients naïfs portent au moins trois mutations mineures de résistance aux inhibiteurs de protéase (IP), alors qu'elle

n'est que 8% pour le B. La question de la sensibilité aux antirétroviraux, 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 du VIH-1 de sous-type B (prédominant en Amérique du Nord et en Europe). Cependant, on ignore jusqu'à quel point ces candidats vaccins pourraient conférer une protection croisée contre 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 celles résultant de l'accumulation stable d'une simple mutation au sein d'un type ou d'un sous-type unique.
- Sélection des mutations à l'échec, les profils d'échappement peuvent également être différents selon le sous type de VIH-1. En effet, certaines mutations spécifiques aux sous types peuvent être sélectionnées lors de traitement. Par exemple le sous type C, qui présente de nombreuses spécificités.

### ***3.3. Répartition géographique***

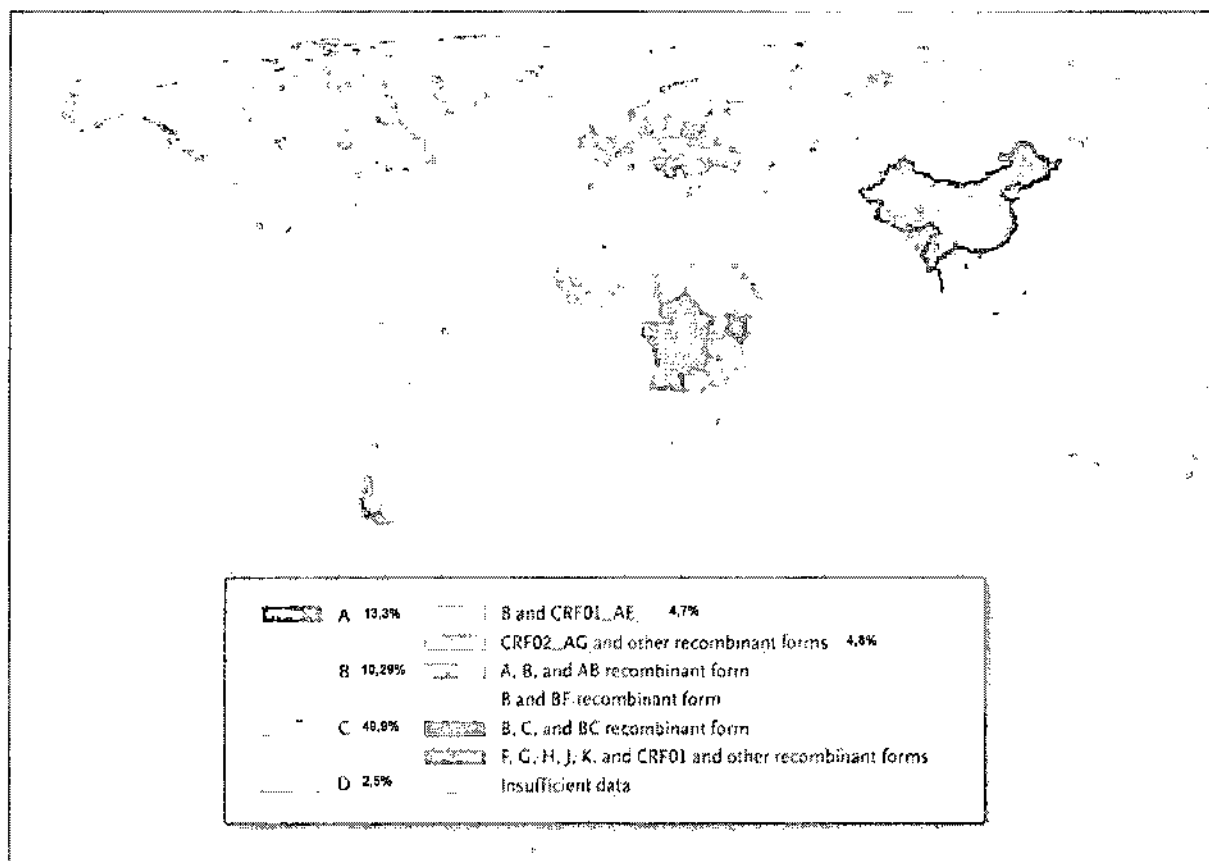
La répartition géographique des VIH-1 diffère selon l'ancienneté de l'épidémie dans le pays et selon les migrations de population [8]. Le VIH-1 est très largement rependu à travers le monde, et pose un problème majeur de santé publique dans tous les continents.

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 en Amérique du Nord, 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.



**Figure 4:** 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 (Taylor et al. 2008)



### 3.4. Cellules cibles des virus VIH [19]

Les cellules sensibles à l'infection VIH sont la sous population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *helper* (ou auxiliaires), en particulier les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires mais aussi les macrophages ou d'autres cellules telles les cellules dendritiques et les cellules de Langherans ainsi que les cellules microgliales du cerveau. Ces cellules présentatrices d'antigènes, ainsi que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos jouent un rôle important de réservoirs viraux, de dissémination et d'entrée du virus dans l'organisme. Dans d'autres cellules, les VIH sont simplement emprisonnés sans se répliquer. C'est le cas par exemple, des cellules folliculaires dendritiques présentes dans les centres germinatifs des ganglions.

### 3.5. Cycle de répllication du VIH

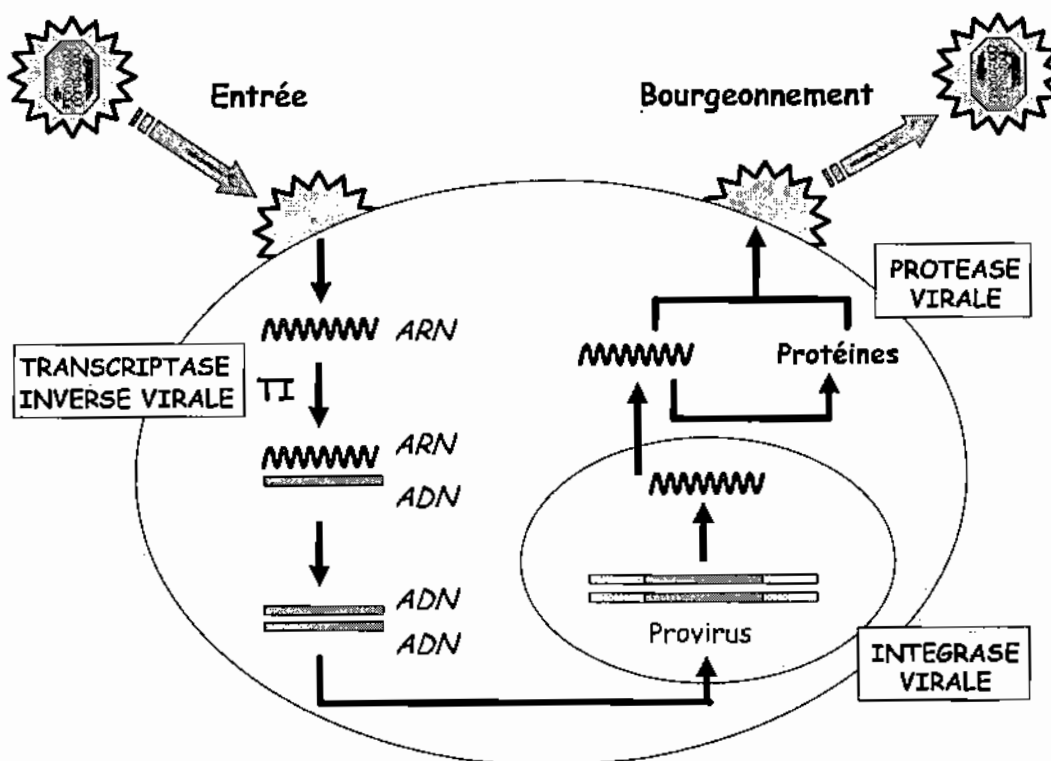


Figure 5 : Schéma du cycle répliatif du VIH [20]

Le cycle de réplication des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se divise en une phase précoce et une phase tardive. Lors de la phase précoce (*early phase*) du cycle, le virus situé dans le milieu extracellulaire se fixe sur les récepteurs CD4 des lymphocytes T CD4+ et des macrophages via ses protéines de surface gp120 et gp41. La fusion membranaire qui s'en suit fait intervenir des co-facteurs cellulaires : CXCR4 (lymphocytes T) et CCR5 (macrophages) et provoque l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme cellulaire. L'ARN viral est ensuite rétro transcrit en ADN double-brin (ADN proviral) grâce à la transcriptase inverse (TI). L'ADN nouvellement synthétisé (ou provirus ou ADNc) est alors orienté vers le noyau de la cellule, lié à un complexe supramoléculaire protéique : le PIC ou complexe de pré-intégration qui contient la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéine de matrice et Vpr. Ces trois dernières semblent jouer un rôle majeur dans l'import nucléaire. Le provirus est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte, grâce à l'intégrase (Figure 5). La phase tardive (*late phase*) du cycle correspond aux étapes permettant d'obtenir des virions complets, qui seront capables de bourgeonner et de mûrir après leur libération dans le milieu extracellulaire (Figure 5).

Cette phase débute par la transcription du provirus. Des ARN courts et doublement épissés, codant pour les protéines Tat, Rev et Nef (dites précoces car produites en premières), sont exprimés. Nef est une protéine accessoire, Tat est un activateur transcriptionnel qui se fixe sur l'ARN en cours de synthèse au niveau de la région TAR (*Trans-Activating Response Element*), permettant ainsi de recruter différentes protéines cellulaires favorisant l'élongation de la transcription. Rev permet l'export des ARNm non complètement épissés via sa fixation sur le RRE (*Rev Responsive Element*) des transcrits primaires et le recrutement de l'exportine-1, et du facteur Ran-GTP. Des ARN non épissés ou simplement épissés correspondant aux gènes gag, gag-pol (protéines de structure interne), env (enveloppe), vif et vpr sont ensuite produits pour donner des protéines dites tardives. Une fois traduits, les différents composants viraux sont orientés vers la membrane cellulaire, s'assemblent pour former un virion qui bourgeonne et finit sa maturation grâce à la protéase dans le milieu extracellulaire.

De multiples facteurs semblent jouer un rôle dans l'évolution lente de la maladie induite par les VIH. Parmi ceux-ci, les phénomènes consécutifs aux interactions virus-hôte et virus-cellule apparaissent primordiaux et leur complexité reflète celle précédemment décrite pour la régulation de la réplication virale.

### **3.6. Effet cytopathique du VIH**

De part leur capacité de fusion liée à l'enveloppe, les VIH sont responsables d'un effet cytopathique caractéristique, la formation de Syncytia, grosses cellules multinuclées qui se lysent rapidement in vitro. Seules les souches X4 ou R5X4 sont dites SI car elles induisent des Syncytia dans des cultures de cellules mononuclées provenant de sujets normaux ou dans des cultures de cellules T en lignée. Les cellules R5 sont dites NSI, car elles n'induisent pas de formation de Syncytia dans les mêmes conditions expérimentales.

### **3.7. Histoire naturelle de la maladie**

L'évolution spontanée, en l'absence de traitement de l'infection à VIH évolue selon 3 phases:

- La phase aiguë ou primo-infection qui dure quelques semaines
- La phase chronique qui dure plusieurs années
- La phase symptomatique qui dure de quelques mois à quelques années

Durant ces 3 phases le virus continue à se répliquer activement.

### **3.8. Classification en stades cliniques**

#### **➤ Selon l'OMS [25]**

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

Patient asymptomatique.

Adénopathies persistantes généralisées.

#### **Stade clinique 2, défini par :**

Perte de poids inférieure à 10 % du poids corporel.

Manifestations cutané muqueuses mineures (dermite séborrhéique, ulcérations buccales récurrentes).

Zona au cours des 5 dernières années.

Infections récidivantes des voies respiratoires supérieures.

#### **Stade clinique 3, défini par :**

Perte de poids supérieure à 10 % du poids corporel.

Diarrhée chronique inexplicée pendant plus d'un mois.

Fièvre prolongée inexplicée pendant plus d'un mois.

Candidose buccale (muguet).

Leucoplasie chevelue buccale.

Tuberculose pulmonaire dans l'année précédente.

Infections bactériennes sévères (pneumopathies par exemple).

**Stade clinique 4, défini par :**

Pneumocystose.

Toxoplasmose cérébrale.

Maladie de Kaposi.

Lymphome.

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

➤ **Selon CDC (*Centers for Diseases Control*) modifiée en 1993**

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

Catégorie A, qui correspond au stade 1 de l'OMS

Catégorie B

Manifestations cliniques chez un patient infecté par le VIH, ne faisant pas partie de la catégorie C et qui répondent au moins à l'une des conditions suivantes :

Elles sont liées au VIH ou indicatives d'un déficit immunitaire ;

Elles ont une évolution clinique ou une prise en charge thérapeutique compliquée par l'infection VIH. (Cette catégorie correspond aux stades cliniques 2 et 3 de l'OMS).

Catégorie C

Cette catégorie correspond à la définition du sida chez l'adulte. Les critères cliniques sont les mêmes que le stade clinique 4 de l'OMS.

### **3.9. Diagnostic au laboratoire**

Le diagnostic de l'infection VIH est fondé sur une méthode sérologique indirecte c'est-à-dire sur la détection des anticorps, et reste dans la majorité des cas. L'approche diagnostique la plus pertinente et la plus accessible. La mise en évidence du virus par la méthode directe se fait par multiplication en culture cellulaire, par détection immunologique ou moléculaire. Cette méthode peut être utile, à visée diagnostique, elle est indiquée dans les situations

d'échec du diagnostic indirecte, en particulier pendant la fenêtre sérologique de la primo infection [26].

### **3.9.1. Diagnostic indirect**

Le dépistage et le diagnostic biologique indirect de l'infection par le VIH reposent sur une stratégie en deux temps : analyse de dépistage, puis analyse de confirmation. L'analyse de dépistage utilise le test ELISA (test ELISA combiné qui permet la détection simultanée des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2). Un test négatif est l'absence d'infection. Un test positif doit être confirmé avec le Western blot (WB) ou l'immunoblot (Ib).

### **3.9.2. Diagnostic direct**

Il permet la détection directe du virus dans les prélèvements. La détection de l'antigène p24, la culture virale, l'amplification génique et l'hybridation amplifiée peuvent être utilisées à des fins quantitatives, pour estimer le niveau de répllication du VIH dans l'organisme [26].

#### **3.9.2.1. Technique de biologie moléculaire**

##### **3.9.2.1.1. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Mise au point en 1985 par Karry Mullis, la PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de l'amplifier exponentiellement.

##### **3.9.2.1.2. Réactifs utilisés lors de la PCR**

Les réactifs [18] utilisés dans la PCR sont :

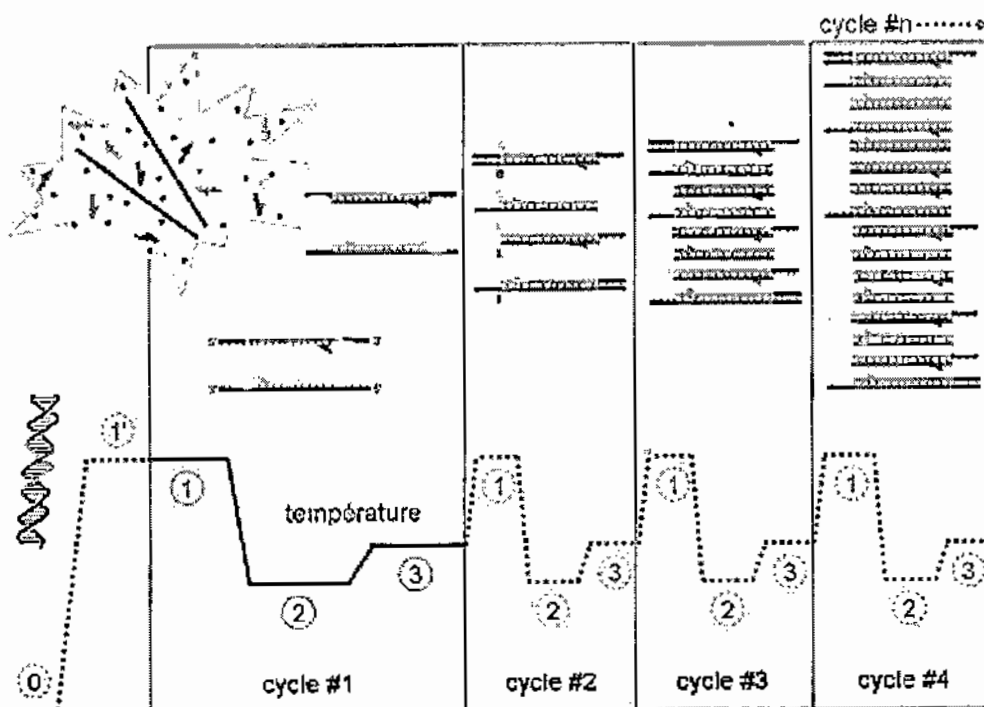
- l'ADN généralement sous forme de double brin contenant le fragment à amplifier ;
- deux amorces sens et anti-sens qui sont de petits brins d'ADN (d'environ 20 bases) appelés oligonucléotides. Ils sont capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire ;

- une enzyme, ADN Polymérase qui est une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*.
- la température optimale d'action de la Taq est de 72° et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°, ce qui permet l'automatisation de la procédure.
- quatre nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs qui sont des éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires ;
- le MgCl<sub>2</sub> permet une meilleure dissociation de l'ADN double brin et fidélise l'action de la polymérase.

### 3.9.2.1.3. Réaction de PCR

Une réaction de PCR [18] correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- Dénaturation de l'ADN (94-95°) : les doubles brins d'ADN se séparent.
- Hybridation ou anelage des amorces (55-57°) : les amorces reconnaissent leur séquence complémentaire et s'hybrident chacune sur leur brin respectif.
- Elongation ou extension des amorces (72°) : la Taq Polymérase permet d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' 3'.



## **Figure 6: Principe de la PCR**

### **3.9.2.1.4. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les fragments d'ADN après PCR ou digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. C'est une technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. Les fragments d'ADN, chargés négativement en milieu basique, se déplacent vers l'anode quand ils sont placés dans un champ électrique. Leurs charges étant à peu près équivalentes, c'est donc leurs masses moléculaires qui vont régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc loin de leur puits d'inclusion.

La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un produit spécifique tels que le bromure d'éthidium (produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques) ou le nitrate d'argent. L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose, permet des séparations jusqu'à 20-25kb (20000-25000pb). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple : 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA) [27].

### **3.9.2.1.5. Séquençage de l'ADN**

#### **3.9.2.1.5.1. Principe**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN [28]. 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 didésoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérases après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement

hydroxyle sur le carbone 3'. Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic de certaines maladies héréditaires. Elle reste néanmoins coûteuse et réservée à certains gènes en nombre limités et de petites tailles.

#### **3.9.2.1.5.2. Réaction du séquençage**

Le fragment d'ADN à séquencer est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant :

- l'amorce à partir de laquelle la synthèse du néo brin sera réalisée par une ADN polymérase,
- les 4 désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG),
- les 4 didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct,
- une ADN polymérase (en général la Taq DNA polymérase).

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un désoxynucléotide ou un didésoxynucléotide. Dans le cas où elle incorpore un désoxynucléotide, la synthèse peut continuer, dans le cas contraire elle s'arrête. Ce choix étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement vu un certain nombre de fois l'incorporation d'un didésoxynucléotide, si bien que le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néo synthétisées possibles. Ces molécules sont ensuite dénaturées puis migrées dans un gel d'électrophorèse afin d'être séparées selon leur taille. On peut ainsi reconstituer la séquence en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néo synthétisés, du plus petit (premier nucléotide de la matrice) au plus grand (dernier nucléotide de la matrice).



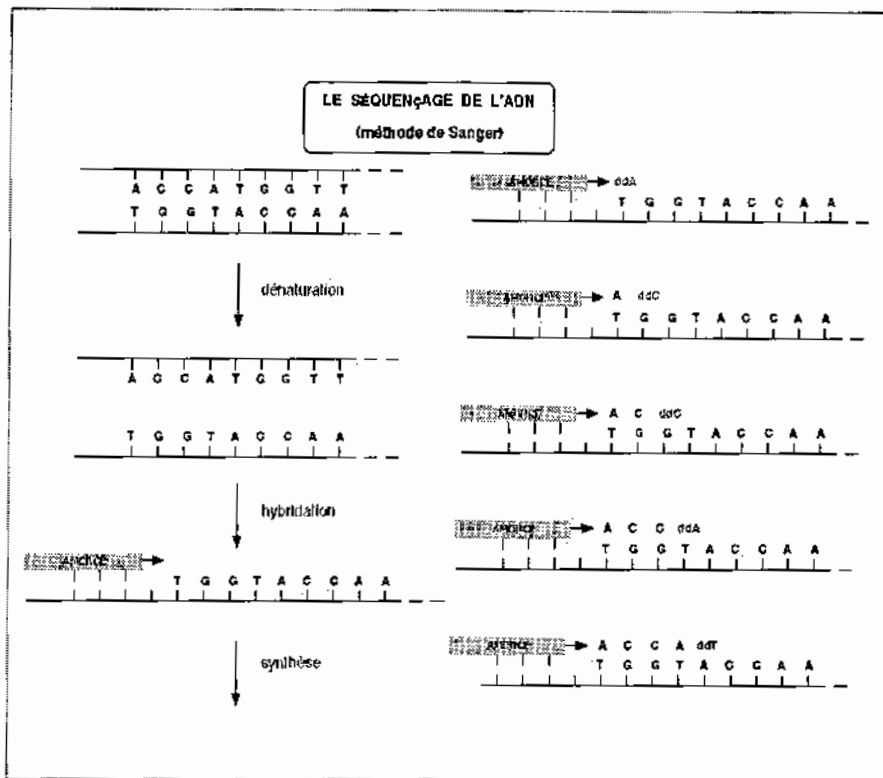


Figure 7: Principe du séquençage de l'ADN

### 3.9.5. Outils bioinformatique d'analyse des séquences D'ADN

#### 3.9.5.1. Objet de la bioinformatique [29]

La bioinformatique est une discipline basée sur les acquis de la biologie, des mathématiques, et de l'informatique. Elle consiste en l'ensemble des méthodes et programmes pour gérer, organiser, comparer, analyser, explorer, l'information génique et génomique stockée dans les bases de données dans le but de prédire et produire de nouvelles connaissances et de développer aussi de nouveaux concepts.

#### 3.9.5.2. Analyse de séquences

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

- Quantifier et localiser la similarité

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

### **3.10. Généralités sur le traitement et les résistances aux ARV**

#### **3.10.1. Traitement**

##### **3.10.1.1. Définition des ARV**

Un antirétroviral (ARV) est une classe de médicament utilisée pour le traitement des infections liées aux rétrovirus. Il s'agit de médicaments essentiellement virostatiques (actif sur VIH-1 et VIH-2) dont la plupart agit généralement par inhibition enzymatique. Il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement permettant de guérir du sida, malgré les efforts de la science, mais l'administration d'ARV modifie profondément l'évolution de la maladie en réduisant rapidement la réplication virale avec disparition du virus dans le plasma et suppression presque totale de la production virale dans les organes lymphoïdes [30].

##### **3.10.1.2. Objectifs du traitement antirétroviral**

L'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le SIDA en restaurant un nombre de lymphocytes CD4 supérieurs à 500/mm<sup>3</sup>. Pour atteindre cet objectif, le traitement antirétroviral doit rendre indétectable la charge virale plasmatique en dessous du seuil de détection (200, 50, 20 copies/ml selon les techniques). Ceci permet une meilleure restauration immunitaire et limite au maximum le risque de sélection de virus résistants aux traitements ARVs [3].

Si l'efficacité immunovirologique du traitement est essentielle, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément :

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

### **3.10.1.3. Molécules disponibles**

En 2009, de nombreux antirétroviraux sont disponibles dans six classes médicamenteuses et agissent sur cinq cibles (transcriptase inverse, protéase, intégrase, gp41 et CCR5) :

- inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI),
- inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI),
- inhibiteurs de protéase (IP),
- inhibiteurs de fusion (IF T20),
- inhibiteurs d'intégrase (INIs),
- inhibiteurs du CCR5 (Anti-CCR5)

Parmi ces classes, seulement trois sont actuellement disponibles au Mali à savoir les INTI, les INNTI et les IP. Les combinaisons de ces molécules antirétrovirales ont permis de transformer le pronostic d'une infection rétrovirale dont l'histoire naturelle était létale chez plus de 90% des patients en une infection chronique n'entraînant pas de déficit immunitaire cliniquement significatif [31].

**Tableau III Molécules antirétrovirales disponibles avec une autorisation de mise sur le marché ou non en 2009**

<b>DCI</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Nom de spécialité</b>	<b>Laboratoire pharmaceutique</b>
<b>Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse</b>			
Zidovudine	AZT	Rétrovir I®	GlaxoSmithKline
Didanosine	DDI	Videx®	Bristol-Myers quibb
Stavudine	D4T	Zérit®	Roche
Lamivudine	3TC	Épivir®	GlaxoSmithKline
Emtricitabine	FTC	Emtriva®	Giléad
Abacavir	ABC	Abacavir®	GlaxoSmithKline
<b>Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse</b>			
Ténofovir disoproxil	TDF	Viréad®	Giléad
<b>Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse</b>			
Névirapine	NVP	Viramune®	Boehringer
Efavirenz	EFV	Sustiva®	Bristol-Myers Squibb
Étravirine	ETV		Tibotec
<b>Combinaisons d'inhibiteurs de la transcriptase inverse</b>			
Zidovudine + Lamivudine	AZT + 3TC	Combivir®	GlaxoSmithKline
Abacavir + Lamivudine	ABC + 3TC	Kivexa®	

*Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.*

Ténofovir + emtricitabine	TDF + FTC	Truvada®	Giléad
Lamivudine+ Stavudine + Nevirapine	3TC + d4T+ NVP	Triomune®	
Zidovudine + Lamivudine +Abacavir	AZT+3TC+ABC	Trizivir®	GlaxoSmithKline
Ténofovir + emtricitabine + éfavirenz	TDF+FTC+EFV	Atripla®	
<b>Inhibiteurs de la protéase</b>			
Saquinavir	SQV	Invirase®	Roche
Ritonavir	RTV	Norvir®	Abbott
Indinavir	IDV	Crixivan®	MerckSD
Amprénavir	APV	Agénérase®	GlaxoSmithKline
Fosamprénavir	Fos-APV	Telzir ®	GlaxoSmithKline
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra®	Abbott
Atazanavir	ATZ	Réyataz®	Bristol-Myers Squibb
Tipranavir	TPV	Aptivus®	Boehringer
Darunavir	DRV	Prézista®	Tibotec
<b>Inhibiteur de fusion</b>			
Enfuvirtide	T20	Fuzéon®	Roche
<b>Inhibiteur du corécepteur CCR5</b>			
Maraviroc	MRV	Celsentri ®	Pfizer

**Inhibiteurs de l'intégrase**

Raltégravir

RVG

Isentress®

Merck

Élvitegravir

EVG

Giléad

#### **3.10.1.4. 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 ont accès aux antirétroviraux. En Afrique subsaharienne, seulement 30% 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 lypodystrophique, anomalies glucidolipidiques) laissent présager une incidence accrue de complications vasculaires à moyen ou à long terme.

#### **3.10.1.5. Stratégies de traitement antirétroviral**

Les schémas à base de combinaisons fixes sont recommandés. La stratégie déterminante en 1996 dans l'obtention d'une réduction maximum de la charge virale était la trithérapie comportant deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), associés à un inhibiteur de protéase (IP). Actuellement, d'autres stratégies telles que deux INTI et un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI), qui est d'ailleurs le plus utilisé en Afrique de l'Ouest, voire trois INTI (surtout dans les situations suivantes : tuberculose, VIH1+2, et VIH/Virus de l'Hépatite B (VHB), même VIH-1, VIH-2), ont conquis le titre de HAART (*Highly Active Antiretroviral Thermaux*), que l'on pourrait traduire par « multithérapie fortement efficace ».

Ces stratégies permettent d'obtenir une réduction maximale de la charge virale, ce qui est l'objectif clé de tout traitement, cependant les stratégies antirétrovirales, quelles que soient

leurs efficacités, ne peuvent éradiquer le virus de l'organisme et donc « guérir » de l'infection rétrovirale [31].

En thérapeutique antirétrovirale, le premier choix des molécules pour le traitement doit être le bon et le plus puissant, donc déterminant dans la mesure où il influence les options thérapeutiques ultérieures. Au moment du choix, il faut prévoir d'emblée des alternatives pour d'éventuels cas d'échec ou de toxicité [32]. Il faut aussi optimiser l'observance aux ARV, afin de garantir le succès des programmes en cours.

### **3.10.1.6. Associations recommandées [32]**

#### **Traitement de 1<sup>ère</sup> ligne, infection à VIH-1**

Le traitement de première ligne correspond au traitement d'un patient naïf ou ayant changé certaines molécules de cette ligne pour cause d'intolérance.

(Lamivudine ou entricitabine) + (Zidovudine ou ténofovir ou stavudine) + (névirapine ou efavirenz)

#### **Traitement de 2<sup>ème</sup> ligne**

Le traitement de seconde ligne correspond au traitement de 2<sup>ème</sup> intention après échec au schéma de la 1<sup>ère</sup> ligne (Abacavir ou Zidovudine) + (didanosine) + (1 inhibiteur de protéase booster de ritonavir) Le choix préférentiel d'IP en second ligne est le lopinavir/ritonavir ou l'atazanavir/ ritonavir. Le choix préférentiel d'une seconde ligne chez un patient ayant reçu en 1<sup>ère</sup> ligne, (AZT ou D4T) + (3TC) + (NVP ou EFV) est l'association : zidovudine + didanosine + lopinavir/ritonavir. Lorsque la 1<sup>ère</sup> ligne comprenait une association de type (TFD) + (3TC ou FTC) + (NVP ou EFV), on prescrit en seconde ligne l'association zidovudine + didanosine + lopinavir/ritonavir.

L'association TFD + (3TC ou FTC) en seconde ligne ne pourra être envisagée qu'en cas de détection précoce de l'échec thérapeutique chez un patient ayant reçu en 1<sup>ère</sup> ligne : (AZT ou D4T) + 3TC + (NVP ou EFV). Dans ce cas, on privilégiera l'association TDF + (FTC ou 3TC) plutôt que l'association ABC + (3TC ou FTC)

#### **Traitement de troisième ligne et/ou multi-échec**



2INTI + (darunavir/ritonavir ou raltégravir) + étravirine, dans ce cas précis, une discussion pluridisciplinaire (cliniciens, virologues, pharmacologues) peut être très utile.

### **3.10.1.7. Critères d'éligibilité [25].**

➤ Adultes et adolescent :

- ✓ Traiter dès que le taux de CD4  $<350$  cellules/mm<sup>3</sup> quelque soit l'état clinique
- ✓ Le taux de CD4 est nécessaire pour évaluer si les patients HIV au stade clinique 1 et 2 ont besoin de commencer le traitement ARV
- ✓ Traiter tous les patients aux stades cliniques 3 et 4 quelque soit le taux de CD4

➤ Enfant de plus de 12 mois :

CD4  $<20\%$  ou CD4  $<750$  en valeur absolue pour les enfants de 12 à 35 mois,

CD4  $<20\%$  Ou CD4  $<350$  pour les enfants de 35 mois au plus.

➤ Enfant de moins de 12 mois :

Traiter tous quelque soit le stade clinique ou immunologique

### **3.10.1.8. Echec thérapeutique [5, 33]**

On appelle échec thérapeutique l'ensemble des situations suivantes :

- l'échec clinique, qui se caractérise par la survenue de manifestations cliniques, qui peuvent être des symptômes dus au VIH, survenue d'une nouvelle infection opportuniste ou d'une tumeur ou la rechute d'une infection opportuniste antérieure.
- L'échec immunologique, qui se définit par la chute du taux de lymphocytes CD4 en absence de toute autre infection concomitante et malgré le traitement.
- L'échec virologique, la situation la plus fréquente, qui se caractérise par une répllication virale, conséquence d'une inefficacité de la combinaison thérapeutique. Ce manque d'efficacité peut être dû à plusieurs choses dont, la sélection des variants viraux portant des mutations de résistance vis-à-vis d'une ou plusieurs molécules antirétrovirales. De tel échec peut être défini de plusieurs manières : une non-réponse au traitement caractérisée par une baisse de la charge virale plasmatique (CVp)

inférieur à 1log après un mois de traitement. Un échec primaire correspond à une persistance de la CVp > 50cp/ml six (6) mois après le début de traitement. Un échec secondaire est définie par un rebond de la CVp>50 copie/ml sur deux prélèvements consécutifs après une période de succès virologique.

Après la mise en évidence d'un échec virologique, il convient de réaliser un test génotypique qui permettra de rechercher les mutations de résistance présentes dans les gènes ciblés par les molécules antirétrovirales [33].

### **3.10.2. Résistance du VIH-1 aux ARV**

#### **3.10.2.1. Définition**

La résistance aux antirétroviraux a été rapportée pour la première fois en 1989 chez des patients traités par la Zidovudine en monothérapie [34]. Depuis cette date, les thérapeutiques antirétrovirales contre le VIH se sont diversifiées et la résistance a été reconnue comme l'une des causes majeures d'échecs thérapeutiques. Elle est définie par la présence de mutations sur les gènes codant les enzymes (protéase, transcriptase inverse, intégrase) ou des protéines (protéine de fusion) cibles des antirétroviraux. On distingue deux types de résistance : la résistance acquise sous traitement, et la résistance primaire. En effet, pour cette dernière, les patients porteurs de virus résistants peuvent transmettre ces virus à leurs partenaires qui vont alors s'infecter d'emblée avec des virus résistants lors de la primo-infection.

#### **3.10.2.2. Mécanismes d'apparition des mutations de résistance**

Plusieurs facteurs liés à la durée de vie et au cycle de réplication du VIH peuvent être responsables d'une émergence rapide et généralisée de la résistance observée chez un 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 selon l'antirétroviral dans une même classe [3].

Ces mécanismes peuvent être dus :

- Variabilité génétique importante du VIH,

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

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

- Dynamique de production virale très rapide, il a été calculé qu'environ 10 milliards de virions étaient produit chaque jour chez une personne infectée [26].
- Préexistence, avant tout traitement, de variants viraux présentant des mutations de résistance aux ARV, qui peuvent s'accumuler.

### **3.10.2.3. Mécanismes de la résistance aux antirétroviraux [34]**

Il est communément admis que les mutations de résistance entraînent des changements en acides aminés diminuant la fixation de l'inhibiteur sur la cible. Différents mécanismes de résistance ont été identifiés en fonction des classes d'antirétroviraux.

#### **3.10.2.3.1. Les analogues nucléosidiques**

Les analogues nucléosidiques agissent comme des terminateurs de la synthèse de l'ADN viral par la transcriptase inverse. Ces molécules sont phosphorylées par des kinases cellulaires générant des nucléotides triphosphates qui peuvent alors être incorporés dans la nouvelle chaîne d'ADN en formation. Ces composés ne possèdent pas de groupement OH en position 3'. De nouveaux nucléotides ne peuvent plus se fixer et la synthèse d'ADN viral est alors arrêtée.

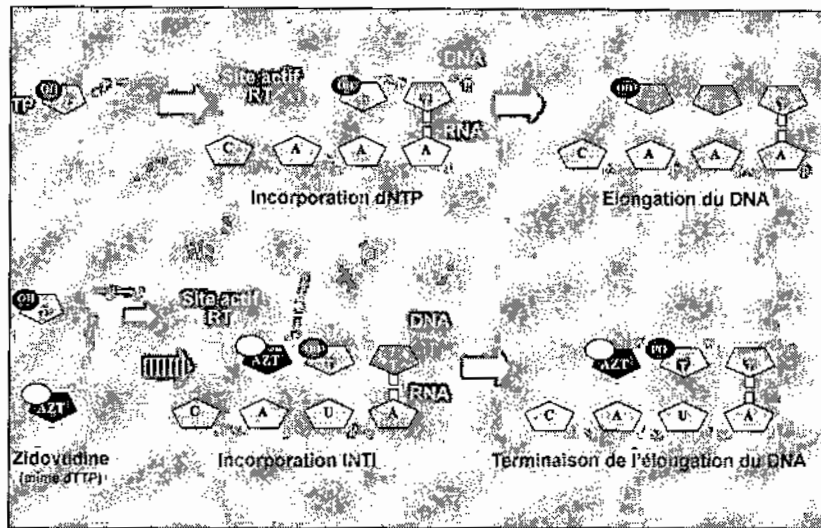


Figure 8 : Mode d'action des INTI

Les inhibiteurs nucléosidiques sont de puissants inhibiteurs de la TI, et une nouvelle classe d'analogues nucléotides, Tenofovir, est aussi disponible pour l'usage clinique. Le mécanisme d'action est identique à ce de l'analogues nucléosides, avec la principale différence structurale car le Tenofovir est une deoxyadenosine acyclique (fig8). Ces deux groupes d'analogues ciblent le site actif sur la TI qui est engagé dans la polymérisation de l'ADN, ils peuvent empêcher l'infection de cellules susceptibles mais n'auront pas d'effet sur les cellules qui abritent déjà le VIH.

Deux mécanismes moléculaires distincts ont été identifiés comme étant à l'origine de la résistance aux analogues nucléosidiques : la diminution de l'incorporation de l'analogues lors de la synthèse de l'ADN et excision de l'analogues de la chaîne d'ADN.

- Le premier est la mutation des résidus qui résultent en diminuant l'incorporation des nucléotides ou nucléosides artificiels au profit des nucléosides naturels dans la chaîne d'ADN en formation. Pendant que certaines de ces mutations apparaissent dans le site catalytique actif de la TI, d'autres sont proximales de ce site, et peuvent tous causer un changement conformationnel dans l'enzyme responsable de la résistance (fig9).

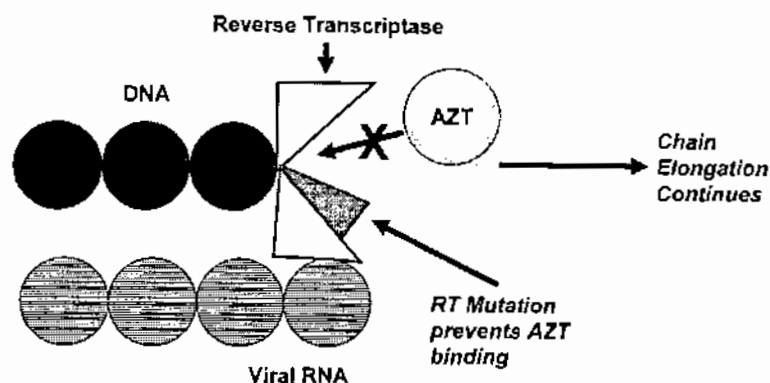


Figure 9: mutation sur la RT empêche l'attachement de l'AZT [35]

Ainsi, pendant que les mutations des analogues de la thymidine affectent principalement l'AZT et le d4T, un nombre de mutations a été aussi observé pour d'autres analogues.

La mutation M184V sur le gène de la TI est associée à une résistance de haut niveau à l'analogue de la cytosine 3TC [34]. Un niveau élevé de résistance aux analogues de la guanosine ABC et DDI semble exiger au moins 2 ou 3 mutations concomitantes. La mutation Q151M est le plus souvent sélectionnée après plusieurs lignes de traitement comportant des analogues nucléosidiques. Elle entraîne la résistance de haut niveau à tous les INTI, excepté le ténofovir et la lamivudine. Les mutations K65R et K70E entraînent une résistance principalement par le ténofovir. L'impact de la mutation K65R semble nul sur les analogues de la thymidine. Cette mutation est fréquemment sélectionnée lors de l'utilisation de combinaisons d'INTI qui ne sont pas recommandées (abacavir et/ou didanosine associés au ténofovir sur des virus dépourvus de TAM). L'abacavir en association à la lamivudine sélectionne en priorité la mutation L74V/I avec une fréquence plus importante quand cette combinaison est donnée en une fois par jour et en association aux INNTI.

- Le second mécanisme est associé à un renforcement de l'enlèvement des analogues de ces sites d'attachement à la fin de la chaîne d'ADN appelé excision des analogues ou réaction de phosphorolyse.

Cette excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé est conférée par des mutations appelées TAM (*thymidine analog mutations*). Ces mutations favorisent l'accès de l'ATP au

site de polymérisation de l'ADN proviral, qui va capter l'analogue thymidique inséré, permettant ainsi au nucléoside naturel de s'incorporer, libérant le médicament et mettant fin à son action [5].

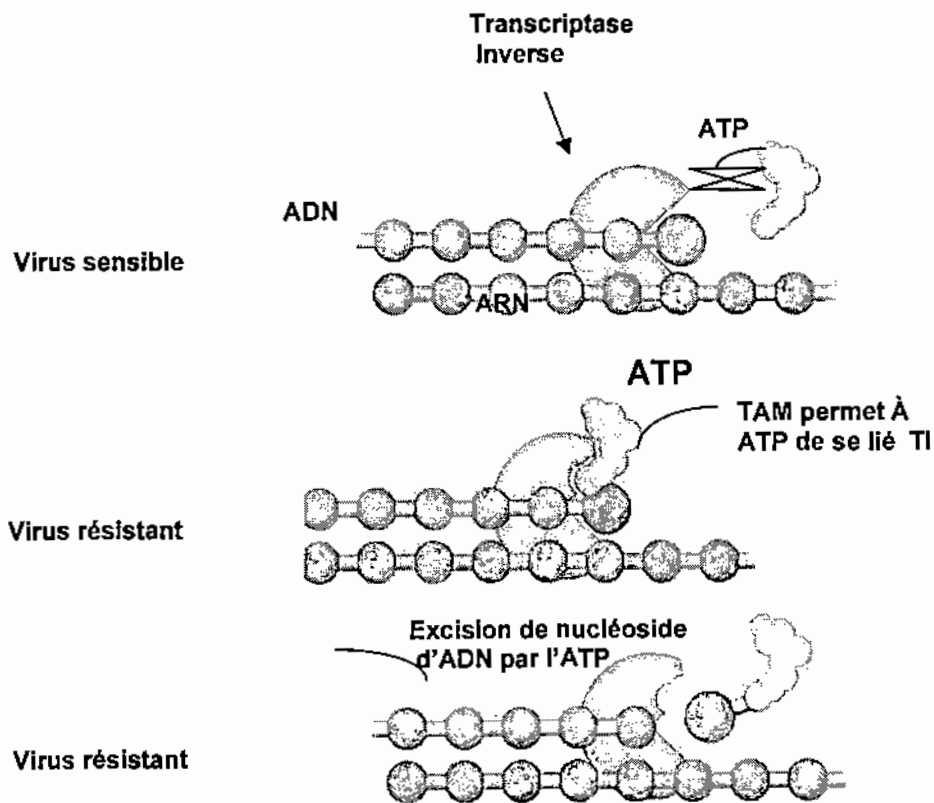


Figure 10: Résistance par excision des analogues nucléosidiques [35]

Elles sont sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, zidovudine et Stavudine, et comprennent six (6) : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, et K219Q/E [5]. Les TAM sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI, sauf à la lamivudine, et à des niveaux divers [34]. 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 dans cette résistance croisée. La mutation M184V, en présence de TAM, augmente la résistance *in vivo* à l'abacavir et n'a pas d'impact sur le ténofovir et la didanosine[34].

Il faut noter que, dans cette classe d'ARVs, la barrière génétique est variable selon les molécules, et en particuliers très faible pour la lamivudine et l'emtricitabine. Un autre mécanisme consistant en des insertions au codon 69 de la transcriptase inverse est également associé à une résistance multiple à l'ensemble des analogues nucléosidiques et au ténofovir.

### 3.10.2.3.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Ce sont des petites molécules qui se fixent au niveau d'une poche hydrophobe située à proximité du site catalytique de la transcriptase inverse. Elles altèrent les enzymes capables de changer de conformation, qui leur rend rigide empêchant sa fonction normale de polymérisation.

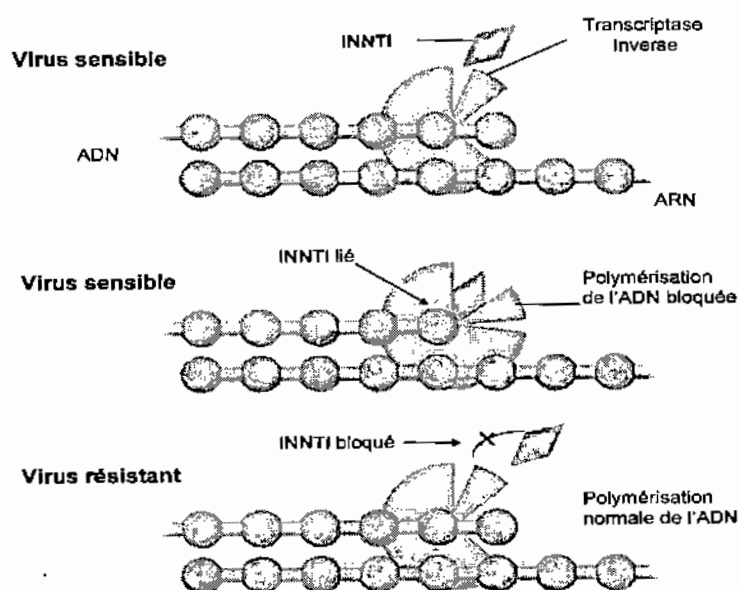


Figure 11 : Mécanisme d'action et de résistance des INNTI [35]

Ces composés sélectionnent des mutations situées au niveau de leur site de fixation qui affectent la flexibilité de l'enzyme, bloquant ainsi la synthèse d'ADN. Une seule mutation à ce niveau peut entraîner une résistance croisée de haut niveau aux INNTI de 1<sup>ère</sup> génération (l'éfavirenz et la névirapine). Si une mutation apparaît dans la poche hydrophobe, l'inhibiteur ne peut plus s'y fixer pour bloquer l'activité de la TI. La présence des mutations **Y181C** et **Y188C** diminue fortement la fixation des INNTI en modifiant la taille et la forme de la poche de liaison [5]. Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est faible. Puisque tous les INNTI essentiellement se lient à la même région de la TI, les mutations dans cette zone affecteront obligatoirement les agents de cette classe dans certaines mesures. Ceci peut expliquer la fréquence élevée de résistance croisée [36]. Cependant, des INNTI de deuxième génération comme étravirine sont actifs sur certains virus ayant des profils de résistance aux INNTI classiques [3]. De plus, l'accumulation de mutation de résistance aux INNTI diminue fortement l'efficacité de l'étravirine. Il est recommandé de ne pas laisser persister de réplication résiduelle sous l'éfavirenz ou névirapine, qui entraîne rapidement l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI et réduit les possibilités de traitement ultérieur par l'étravirine.

La mutation K103N, est la plus fréquente en clinique, stabilise la TI, empêchant ainsi l'INNTI de venir se lier [37]. Les effets secondaires des INNTI sont généralement moins que ceux des analogues nucléosidiques. Cependant le principal inconvénient de ces agents est leur rapide développement de la résistance.

### **3.10.2.3.3. Les inhibiteurs de protéase**

Les particules virales nouvellement assemblées ne sont fonctionnelles ou infectieuses qu'après une maturation finale. Cette maturation nécessite le clivage des précurseurs de protéines virales par des enzymes appelées protéases virales. Ces protéases sont des dimères symétriques avec un core central qui lient les peptides qui doivent être modifiés par l'enzyme. Les IP sont désignés pour s'adapter et se lier au site catalytique de l'enzyme avec une affinité élevée et de bloquer son activité. L'inhibition de l'enzyme permet la libération des particules virales immatures et non infectieux.



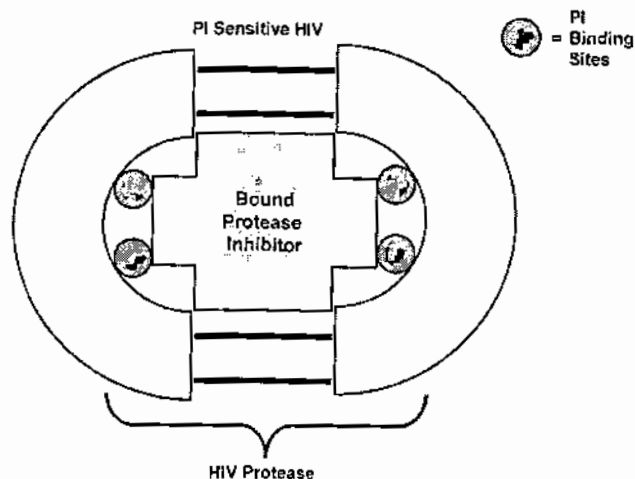
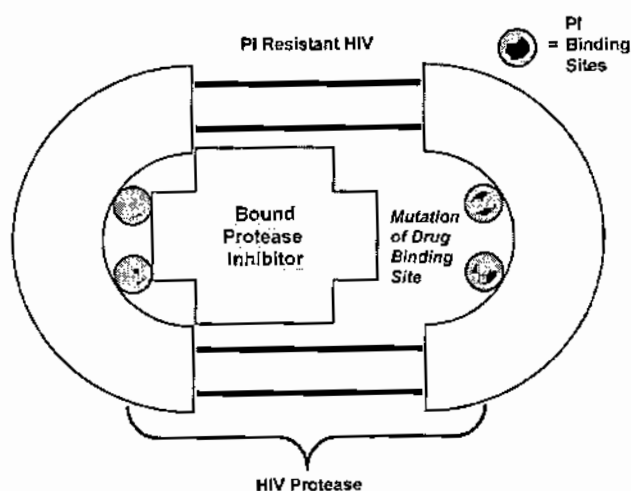


Figure 12: Mécanisme d'action des IP [35]

La résistance aux IP est liée à des mutations situées, d'une part, au niveau du site actif de l'enzyme (mutations majeures), et d'autre part, à distance du site actif, s'accumulent et renforcent une résistance préexistante (mutations mineures). Ces mutations peuvent être également polymorphiques et sont généralement communes à tous les IP [38]. Une mutation majeure va changer la conformation du site actif de la protéase, empêchant ainsi l'IP de s'y fixer [39]. Une mutation mineure ne va pas influencer la liaison de l'IP au site actif. A elle seule, elle ne confère pas de résistance. Mais l'accumulation de celle-ci avec une mutation majeure ou de nombreuses mutations mineures confère une résistance aux IP [40].



**Figure 13 : Les mutations dans la protéase réduit l'affinité et l'effet des IP [35]**

La résistance aux IP est donc, un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations [3] .

Certaines de ces mutations primaires sont spécifiques d'un IP. C'est le cas de la mutation I50L sélectionné par l'atazanavir chez des patients naïfs, qui, *in vitro*, n'entraîne pas de résistance croisée avec les autres IP. Chez des patients ayant déjà reçu d'autres IP, d'autres mutations vont être sélectionnés par l'atazanavir, en particulier, la mutation I84V responsable de résistance croisée aux IP. Les autres IP, comme l'indinavir, le squinavir et le lopinavir, peuvent sélectionner des mutations responsables de résistance croisée, en particulier les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M, qui, lorsqu'elles sont associées, rendent difficile le choix du traitement de relais [34].

De nombreuses études démontrent clairement qu'il existe une grande différence entre les IP potentialisés par le ritonavir (IP/r) et les IP non potentialisés en terme de taux de sélection de mutations de résistance chez les patients naïfs d'antirétroviraux [34]. Les études de résistance menées lors des essais de monothérapie d'IP/r montrent une plus grande fréquence de résistance avec ce type de stratégie, qui et n'est pas recommandée [3]. La notion de barrière génétique forte mérite d'être nuancée. En effet, certaines mutations isolées peuvent être associées à un échec virologique, même au cours d'une première ligne d'un IP/r [34].

Parmi les nouveaux IP, le tipranavir (TPV) semble sélectionné chez les patients prétraités des mutations également sélectionnées par beaucoup d'autres IP (par exemple, V82L/T et I84V) qui sont responsable de résistance croisée [3]. Des études récentes ont démontré qu'il existe des mutations dans le gène gag, au niveau des sites de clivages ou à proximité, qui semblent conférer une résistance aux IP. Cependant, elles ne sont pas systématiquement analysées par les tests génotypiques classiques qui ne séquentent que la protéase virale [3]. Il n'y a probablement pas de résistance croisée entre les analogues du nucléoside (AZT, DDI, d4T,

3TC...) et les inhibiteurs de protéase (SQV, IDV, RTV...). Ces deux types de médicaments agissent de façon entièrement différente sur des gènes différents à des endroits différents du virus [34].

### 2.3.4. Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée du virus dans la cellule requiert plusieurs étapes, comprenant successivement l'attachement du virus (liaison de la gp120 à la molécule CD4), la liaison au corécepteur puis l'association des deux boucles trimériques, HR-1 et HR-2, localisées dans la gp41, conduisant à un rapprochement des membranes virale et cellulaire et à leur fusion.

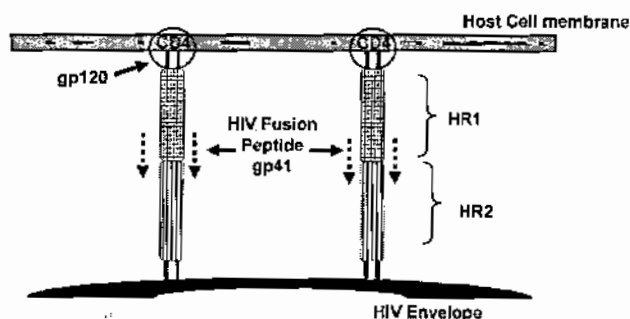


Figure 14 Fusion peplomer du VIH à la membrane de la cellule hôte [35].

Actuellement, de nombreux antirétroviraux en développement explorent la possibilité de bloquer une de ces étapes. L'inhibiteur de fusion, enfuvirtide ou T20, est un peptide symétrique de 36 acides aminés dérivé de la région HR-2 de la gp41, qui lie la gp41 du VIH et empêche les changements conformationnels qui aboutissent à la fusion du VIH et la membrane cellulaire de l'hôte.

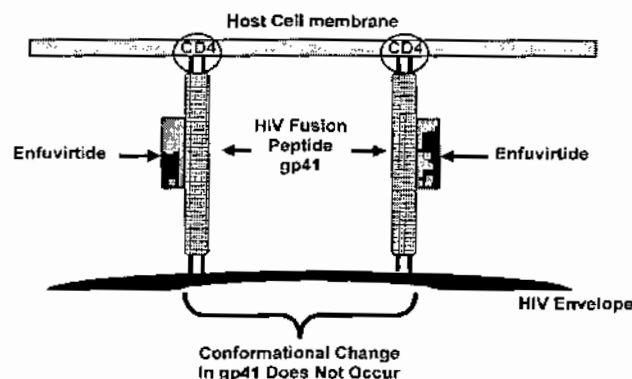


Figure 15 : T-20 lié au peplomer du vih et bloque son mouvement [35]

La résistance de ces molécules est due à des mutations apparaissant sur la gp41 qui sont responsables de la résistance au T20. Elles apparaissent rapidement et empêchent l'inhibiteur de fusion de venir se fixer à la région HR2 de la gp41[41] .

Des mutations dans HR-1 réduisant la sensibilité au T20 ont été identifiées *in vitro* et *in vivo* chez des échappant à l'enfurvitide dans les essais cliniques [3]. Quant à la résistance aux antagonistes du corécepteur CCR5 tel que le MRV, elle est liée à certaines mutations apparaissant dans la boucle V3 de la gp120, résultant en un changement conformationnel qui permet à l'enveloppe virale de se lier au complexe formé par le MRV et le CCR5. Une autre voie d'échappement aux antagonistes du CCR5 est l'émergence de virus à tropisme CXCR4 [42] . Il n'existe pas de résistance croisée entre T20 et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs des corécepteurs CCR5.

#### **3.10.2.3.5. Les inhibiteurs d'intégrase**

Les inhibiteurs d'intégrase du VIH-1 bloquent l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique de la cellule et donc la réplication virale. Le raltégravir (Isentess, RAL) bénéficie d'une AMM depuis Janvier 2008, alors que l'elvitégravir est en cours de développement. Quelques profils de mutations distincts ont été mis en évidence lors d'un échappement au RAL [43]. La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection de mutations se situant au niveau du site catalytique de l'enzyme, et à l'émergence, sous traitement, de variants viraux initialement minoritaires, portant des mutations de résistance [3]. La barrière génétique de cette famille est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète et croisée entre ces molécules. Il convient donc d'être très vigilant et de n'autoriser aucune réplication résiduelle sous traitement comportant un inhibiteur d'intégrase.

#### **3.10.2.4. Les tests de résistance**

La résistance est l'un des facteurs majeurs limitant un succès thérapeutique de l'infection à VIH [35] . Deux méthodes sont actuellement utilisées pour évaluer la résistance du VIH aux médicaments. Les tests génotypiques recherchent les mutations associées à la résistance aux

antirétroviraux. Ces mutations diminuent la sensibilité du virus aux antirétroviraux concernés. Ceci est analysé par des tests phénotypiques où le virus est cultivé en présence du composé.

Le but de ces tests est d'aider le médecin à choisir les médicaments qui pourront être plus efficaces contre les souches qui infectent ses patients. Ils font partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des patients.

#### **3.10.2.4.1. Tests génotypiques [34, 35]**

La résistance génotypique reflète la présence de mutations à l'origine de résistances phénotypiques ou cliniques. Les tests génotypiques permettent d'analyser les mutations présentes dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3, de la gp41 et du co-récepteur CCR5.

Deux kits de séquençage sont disponibles, avec intégration d'un logiciel interprétant le profil de mutation : les kits des firmes Bayer (*Trugene HIV-1 genotyping kit*) et Abbott (*Perkin Elmer ABI Viroseq Genotyping system*) ont reçu l'agrément d'utilisation par l'Agence française de sécurité sanitaire et de la *Food and Drug Administration* aux Etats-Unis.

Ces deux kits, évalués dans un même laboratoire, donnaient des résultats très concordants (97,8%).

Après PCR, le séquençage des gènes avec migration électrophorétique sur séquenceurs automatiques est la technique de référence. Des logiciels traduisent les séquences nucléotidiques en acides aminés. La lecture s'effectue en analysant chaque position connue comme associée à des mutations de résistance, par rapport à une séquence de référence ; la population virale à ce codon peut être sauvage, mutée ou mixte.

La décision de modification thérapeutique, fondée sur les tests génotypiques, semble avoir un impact plus grand sur la réponse virologique chez les patients dont la durée d'exposition préalable aux antirétroviraux n'est pas trop importante. La valeur prédictive des tests

génomiques est d'autant meilleure que des concentrations plasmatiques efficaces d'IP et une bonne observance au traitement sont présentes chez les patients.

Un contrôle de qualité des tests génomiques, organisé par le groupe Résistance AC11 de l'ANRS en France, est réalisé chaque année depuis 2001. Ce contrôle a un rôle pédagogique important, comme atteste par l'amélioration de la performance des laboratoires depuis son instauration.

#### **3.10.2.4.2. Tests phénotypiques**

Le test phénotypique repose sur la détermination de la concentration du produit actif nécessaire pour inhiber la réplication virale de 50% ou 90%. La résistance phénotypique est mesurée en comparant la valeur de la concentration inhibitrice (CI) des isolats viraux testés à celle des isolats de souches sauvages [35] . Trois firmes réalisent de nos jours des tests phénotypiques grâce à la technique de virus recombinants. On peut citer le test Antivirogram® de virco, le test PhenoSense® de Monogram BioScience et le test Phenoscript® d'Euofins Scientific.

#### **3.10.2.5. Les indications et les critères d'utilisation des tests de résistance**

Plusieurs arguments plaident actuellement pour l'instauration d'un test génomique de résistance au moment de la découverte de la séropositivité quelque soit le début du traitement. Il doit être effectué lors d'un changement de traitement antirétroviral après échec virologique. Dans ce cas il est recommandé de réaliser les tests de résistance alors que le patient est sous traitement antirétroviral. Le test de résistance est également recommandé chez les femmes enceintes avant de débiter un traitement et chez les celles qui tombent enceinte au cours du traitement [44].

# MÉTHODOLOGIE

## **4. Méthodologie**

### **4.1. Cadre et lieu d'étude**

Notre étude s'est déroulée au centre de recherche et de formation sur la tuberculose et VIH/SIDA « SEREFO », à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS). SEREFO est un centre de recherche issue de la collaboration entre la FMPOS et les Instituts Nationaux de la santé des Etats unis d'Amérique pour une meilleure formation des chercheurs et la recherche sur le VIH et la tuberculose.

Les activités de SEREFO portent sur :

- Volet laboratoire :

L'activité de laboratoire est axée sur l'isolement, l'identification et la description des variants de souches de mycobactéries d'une part et l'étude de la réponse immunitaire des patients infectés par le VIH et la tuberculose d'autre part. Le laboratoire dispose d'un espace de haute sécurité appelé laboratoire de niveau P3 dans lequel on pratique la culture des mycobactéries. Un laboratoire de sérologie, de charge virale, pour le diagnostic du VIH existe. Un laboratoire de biologie moléculaire permet de réaliser la PCR, le Spoligotyping et le RLFP. L'étude de la réponse immunitaire a lieu dans le laboratoire d'immunologie équipé de Facs counts, Facs Calibur, de LSR II et deux hottes à flux laminaires.

- Volet clinique :

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

### **4.2. Type et période de l'étude**

Il s'agissait d'une étude épidémiologique transversale qui s'est déroulée de mars à décembre 2009.



#### **4.3. Population d'étude**

Notre étude a porté sur les patients recrutés au niveau de cinq sites de prise en charge du VIH à Bamako. Il s'agissait des patients tout venant et répondant aux critères d'inclusion.

#### **4.4. Critères d'inclusion**

- Nous avons inclus tout patient infecté par le VIH-1, sous traitements antirétroviraux et ayant reçu toutes les trois classes d'ARVs disponibles au Mali (INTI, INNTI et IP) et en échec virologique de leur seconde ligne.
- Une charge virale élevée ( $\geq 1000$  copies/ml) et suivi dans un site de prescription des ARVs.

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

Nous n'avons pas inclus :

- patients infectés par le VIH-2
- patients infectés par le VIH-1 et en échec de première ligne de traitement ARV
- patients échec de seconde ligne avec une charge virale inférieure à 1000 copies/ml

#### **4.6. Technique utilisée [44]**

Il s'agissait de faire le génotype de résistance pour tous les patients inclus dans notre étude par un séquenceur (ABI 3130, Applied Biosystems) en utilisant un kit prêt à l'emploi, la technique Viroseq. L'alignement et l'analyse des séquences ont été réalisés par les logiciels Sequencing Analysis et Viroseq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Molecular).

Les données sur les paramètres démographiques, comme l'âge et le sexe, les renseignements sur les traitements reçus ainsi que les paramètres immunovirologiques ont été obtenus à partir de la fiche de demande du test de génotype adressée au laboratoire (cf annexe).

#### **4.6.1. Principe de la technique Viroseq®**

Le viroseq™ HIV-1 Genotyping System détecte les mutations dans les régions de la transcriptase inverse (TI) et de la protéase (PR) du gène pol et fournit un rapport présentant les preuves génétiques d'une résistance virale. Il s'agit d'un système complet fournissant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, à la PCR et à la réaction de séquence. La totalité du gène de la protéase et les deux tiers du gène de la TI sont amplifiés pour générer un amplicon de 1,8 kb. Cet amplicon est utilisé comme matrice de séquençage pour 7 amorces générant une séquence consensus d'environ 1,3 kb. Le logiciel viroseq™ HIV-1 Genotyping System Software assemble, édite et identifie les mutations au niveau de cette séquence de 1,3 kb. Le logiciel compare la séquence consensus avec une référence connue, HXB-2 (issu d'un sous-type B du VIH-1), afin de déterminer les mutations présentes dans l'échantillon. Il utilise ensuite un algorithme de marque déposée pour analyser les mutations et générer un rapport de résistance aux différentes classes d'ARVs (INTI, INNTI et IP).

#### **4.6.2. Réactifs et matériel**

##### **✓ Réactifs**

- Viroseq HIV-1 module préparation des échantillons (ABBOTT, CERELA)  
HIV Viral Lysis Buffer (tampon de lyse virale VIH)  
RNA Diluant (Diluant ARN)
- Viroseg HIV module RT-PCR (ABBOTT, CERELA)  
HIV RT mix ( mélange RT VIH)  
RNase Inhibitor ( Inhibiteur de RNase)  
MuLV Reverse Transcriptase ( transcriptase inverse MuLV)  
HIV PCR Mix ( mélange PCR VIH)  
AmpliTaq Gold DNA Polymerase ( ADN plymerase AmpliTaq Gold)  
AmpErase UNG ( UNG  
DTT (Dithiothreitol)  
DNA Mass Ladder (Echelle de masse moléculaire)  
Agarose Gel Loading Buffer (Tampon de charge en gel d'agarose)
- Viroseq HIV-1 Module de sequencing (ABBOTT, CERELA)

HIV Seq Mix A, B, C, D, F, G et H ( Amorces oligonucléotiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, AmpliTaq DNA Polymerase, Chlorure de magnesium)

Pop6 ( polymer)

Tampon EDTA

Kcl (chlorure de Potassium)

✓ **Matériel**

Séquenceur de type ABI à 4 capillaires (Applied Biosystems, HITACHI)

Deux ordinateurs de bureau

Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µL

Gel d'agarose, contenant du bromure d'éthidium

Système d'électrophorèse en gel d'agarose (cuve à gel à alimentation électrique, 10V/cm de gel d'agarose)

Centrifugeuse, réfrigérée (21000 à 25000 ×g), avec rotor hermétiquement fermé, pour tube de 1,5 mL

Centrifugeuse avec pompe à vide (DryFast®)

Plaque de 96 puits (CERELA)

Ethanol, 100%, non dénaturé (VWR™)

Bromure d'éthidium (Eurobio)

Isopropanol à 100%, anhydre (VWR™)

Tissu non pelucheux

Tubes muni de bouchons à vis, 1,5 mL

Boîte à lumière UV (lampe UV de 300 nM)

Agitateur Vortex

Eau stérile désionisée, exempte de RNase/DNase

Tampon TBE 10X

Pipettes de transfert à embout très fin

Congélateur et réfrigérateur satisfaisant aux conditions de conservation indiquées dans la documentation relative au produit

Hottes de sécurité biologique à flux laminaire, propre

Blouse, gants sans poudre, eau de javel...

#### **4.6.2. Procédure de la technique :**

##### **4.6.2.1. Préparation de l'échantillon et l'extraction de l'ARN viral:**

Recommandations avant de commencer la préparation de l'échantillon :

-Abaisser la température de la centrifugeuse à +4°C

- Décongeler les échantillons et le ARN Diluent (les conserver à +4°C)

1. Pour chaque échantillon, prendre un nouveau tube de 1,5mL ARN/ADNase Free avec bouchon.
2. Transférer 500µL de plasma dans chaque tube
3. Centrifuger les échantillons à 23500g pendant 60 minutes à +4°C
4. Pendant l'heure de centrifugation :
  - Préparer l'ETOH 70% et le mettre au froid
  - Mettre le Lysis Buffer à température ambiante, ou au bain-marie à 37°C
5. Aspirer délicatement le surnageant en faisant attention au culot
6. Précipiter 600µL de Viral Lysis solution dans chaque tube, en s'assurant qu'il n'y a pas de précipité ni de cristaux dans solution
7. Vortexer chaque tube 3 à 5 secondes pour bien mélanger
8. Centrifuger brièvement pour enlever tout le liquide du bouchon
9. Laisser l'échantillon 10 minutes à la température ambiante pour assurer la lyse complète du virus
10. Précipiter 600µL d'Isopropanol dans chaque tube
11. Vortexer chaque tube 3 à 5 secondes
12. Centrifuger les échantillons à 23500g pendant 15 minutes à température ambiante
13. Aspirer délicatement le surnageant en faisant attention au culot
14. Ajouter 1mL d'ETOH 70% froid dans chaque tube
15. Vortexer chaque tube 3 à 5 secondes
16. Centrifuger les échantillons à 23500g pendant 5 minutes à 25°C
17. Aspirer délicatement le surnageant en faisant attention au culot. Donner un coup bref de centrifugeuse pour retirer tout l'ETOH 70% résiduel. Puis sécher le culot 10 minutes.
18. Resuspendre chaque culot avec le RNA Diluent froid en accord avec les indications suivantes

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

NB Maintenir les échantillons dans de la glace.

19. Vortexer 10 secondes pour resuspendre le culot, puis centrifuger

20. Placer immédiatement les échantillons dans la glace si la réaction de RT-PCR est effectuée tout de suite, sinon stocker le RNA à -80°C.

#### 4.6.2.2. Technique de la réaction de RT-PCR (incubation à 60°C)

A préparer pour la réaction de RT :

1. Si nécessaire, décongeler les ARN, vortexer 3-5 sec
2. Marquer un tube de 0,2mL par ARN
3. Décongeler le RT mix et le DTT, Vortexer 3-5 sec
4. Enlever le RNase Inhibitor et la MuLV Reverse Transcriptase du coffret
5. Ne pas vortexer les enzymes
6. Centrifuger tous les réactifs et les échantillons à 2-8°C ou dans la glace une fois utilisés.

Préparer le master mix de la façon suivante :

**Tableau IV : Réactifs et quantités utilisées**

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

Vortexer et centrifuger. Garder le master mix à 25°C

Mettre 10µL d'ARN extrait dans chaque tube.

Programmer le thermocycleur de la façon suivante :

**Tableau V : Protocole d'amplification**

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

Laisser le RT master mix à température ambiante

Mettre en pause l'instrument et retirer immédiatement les échantillons du thermocycleur

Ajouter 10µL de RT master mix dans chaque tube

Vortexer et centrifuger

Remettre les tubes dans le thermocycleur et continuer la réaction de RT en pause.

Laisser les échantillons à +4°C au minimum 10 minutes ou stocké à -20°C

#### 4.6.2.3. Réaction de PCR

Recommandations : -Décongeler le PCR mix et l'UNG, Vortexer et centrifuger

- Centrifuger les enzymes, l'AmpliTag Gold et UNG

Préparer la PCR Master mix de la façon suivante :

**Tableau VI : Réactifs et quantités utilisées**

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

Vortexer et centrifuger

Ajouter 30µL de PCR Master mix dans chaque tube provenant de la réaction de RT

Charger les échantillons sur le thermocycleur et programmer de la façon suivante :

**Tableau VII: Protocole d'amplification de la PCR**

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

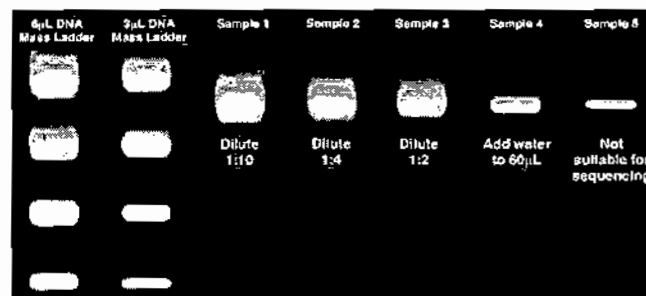
#### **4.5.2.3. Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence**

Purification des produits de PCR suivant le protocole des colonnes Microcon-100

1. Pour chaque échantillon, insérer une colonne Microcon-100 Spin dans un tube de collection Microcon de 1,5mL.
2. Ajouter 300µL de KCl dans chaque colonne sans toucher la membrane.
3. Charger les 50µL de la réaction de PCR en haut et au centre de la colonne sans toucher la membrane.
4. Fermer les capuchons de chaque tube et centrifuger pendant 15 minutes à 10000rpm
5. Ouvrir les capuchons et ajouter 300µL d'eau distillée dans le centre chaque colonne.
6. Inverser la colonne et la placer dans un nouveau tube de 1,5mL
7. Centrifuger pendant 5 minutes à 10000rpm
8. Enlever et jeter les colonnes, les tubes doivent approximativement contenir entre 40 et 50µL de produit de PCR purifiés.

### **Déposer sur gel d'agarose pour confirmer et quantifier les produits de PCR**

1. Préparer un gel d'agarose à 1% contenant 0.5µg/mL de Bromure d'éthidium.
2. Mixer 5µL de produit de PCR purifiés avec 5 µL de Gel Loading Buffer sur du parafilm.
3. Charger 6 µL de DNA mass ladder en position 1 et 3 µL de DNA mass ladder en position 2 sur le gel.
4. Charger les 10µL du mix (Produit de PCR + Gel Loading buffer) sur le gel à partir de la position 3 sur le gel.
5. Migrer pendant 30 minutes à 90 volts
6. Examiner le gel sous la lumière ultra violette UV et photographier le gel.
7. Après la photo, diluer les produits de PCR purifiés pour avoir une concentration optimale de la façon suivante :



**Figure 16 : Photo de gel**

#### **4.6.2.4. Réaction de séquence**

- Décongeler les 7 amorces mixes (A, B, C, D, F, G, H).
- Ajouter 12µL de chaque Primer mix sur une plaque vide
- Ajouter 8µL (ou 10µL si la CV est faible) de produit de PCR purifié dans chaque puit de la plaque contenant l'un des 7 primers.
- Vortexer et centrifuger la plaque
- Charger les échantillons sur le thermocycleur et démarrer le programme suivant :



**Tableau VIII: Protocole d'amplification de la réaction de séquence**

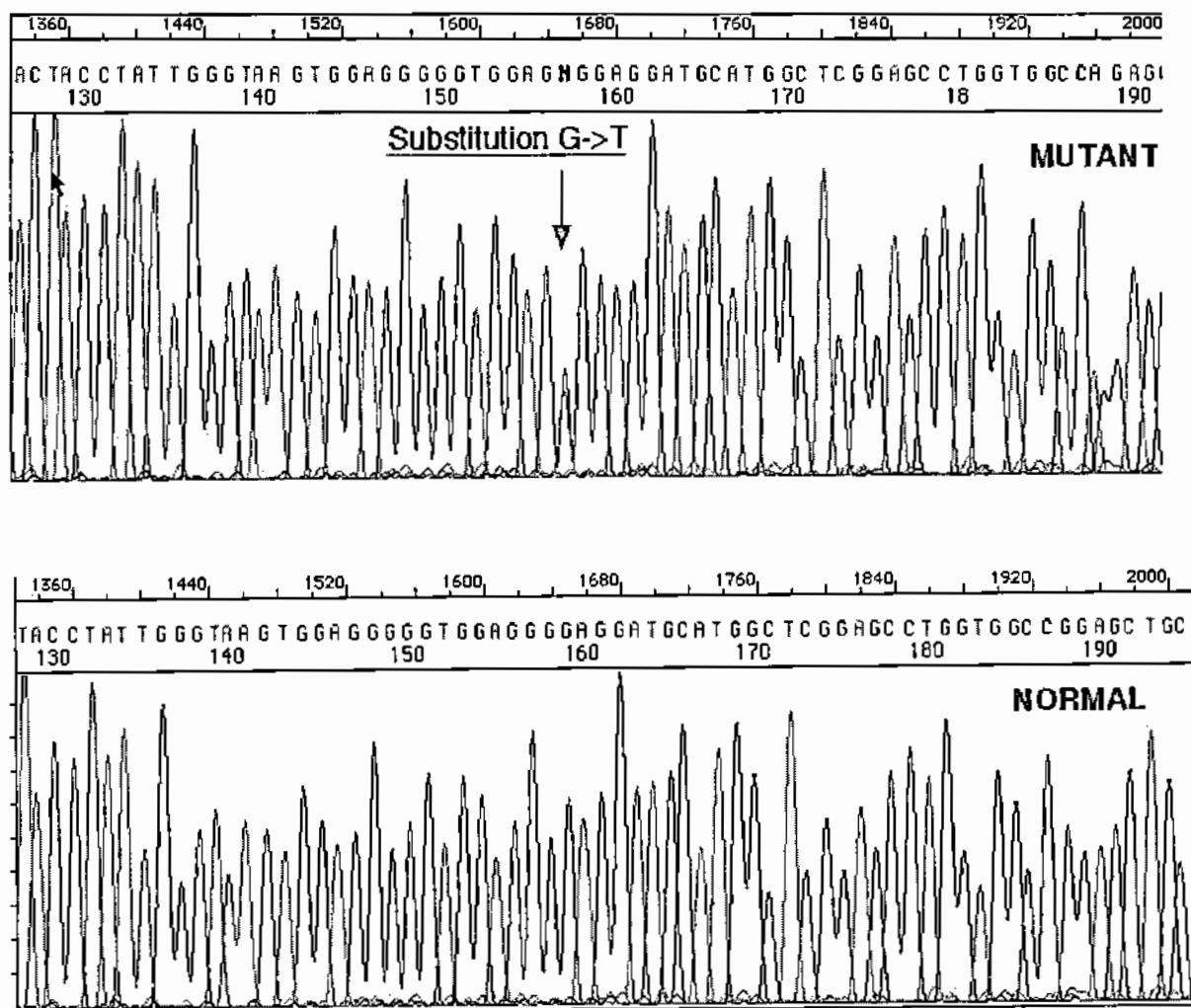
Nombre de cycle	Température	Temps	Processus
25	96°C	10 secondes	DNA
	50°C	5 secondes	Dénaturation
	60°C	4 minutes	Primer
			Annealing
		Primer	
		Extension	
-	4°C	HOLD	-

Après la réaction de séquence, nous avons procédé à la purification des produits de PCR séquence par la méthode « NUCLEO FAST 96 de Machely Nagel », qui consiste, après la mise en place du dispositif (voir annexe), à resuspendre les produits de PCR séquence (tout en respectant l'ordre du schéma de plaque PCR séquence) dans 200µL d'eau DNA free pour la purification à l'aide d'un système sous vide. Pour récupérer les ADN marqués et purifiés, nous avons déposé 50µL d'eau DNA free, bien mélanger puis distribuer 20µL de ces ADN marqués dans une plaque de séquence ABI 3130.

#### 4.6.2.4. Résultats et interprétation

A la fin des runs, les échantillons ont été analysés immédiatement par le logiciel « *Sequencing analysis* » sur l'ordinateur relié au séquenceur, puis ré analysés sur un autre ordinateur où les séquences ont été ensuite alignées par rapport à une séquence de référence de VIH-1, HXB2, grâce au logiciel Viroseq. Les mutations de résistance sont répertoriées en soumettant la séquence dans la base de données stanford et celle de l'ANRS (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>) et la recherche d'homologie entre nos séquences et celles d'autres isolats a été faite à partir de cette base de donnée.

*Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.*



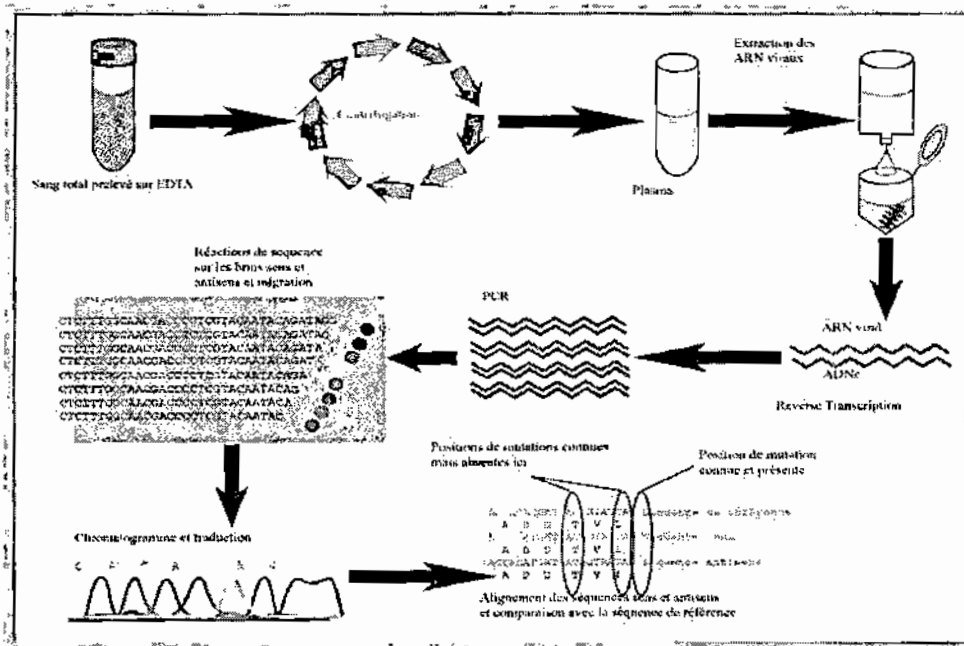
**Figure 17 : Exemple d'alignement des séquences nucléotiques**

La substitution de G à T désigné par N, est une double population, c'est-à-dire une souche sauvage et souche mutée.

Le site ([www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi](http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi)) a été utilisé pour identifier les sous types de VIH rencontrés chez nos patients, en soumettant nos séquences dans la base de données de ce site.

Le rapport de résistance aux antirétroviraux généré par le logiciel Viroseq® (cf annexe) a été discuté au staff clinico-biologique de la Cellule Sectorielle de Lutte contre le SIDA et remis au médecin pour la prise en charge.

**Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.**



**Figure 18** Schéma de la méthodologie du génotypage

**4.5.2.7. Analyse des données**

Nos données ont été saisies dans Microsoft Word et Excel, et l'analysé par le logiciel SPSS. Nos références ont été collectées et insérés avec le logiciel EndNote program.

# RÉSULTATS

## 5. Résultats

Nous avons recrutés 45 patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leurs traitements antirétroviraux de seconde ligne. Ces patients proviennent essentiellement de cinq (5) sites de prise en charge des patients (SPEC) infectés par le VIH à Bamako. Il s'agissaient du centre d'écoute d'animation et de conseil (CESAC) ; du service de médecine interne du CHU du point G (MedInt/HPG), des services de gastro-entérologie (Gastro/HGT) et de la pédiatrie (Ped/HGT) du CHU du Gabriel Touré, et de l'unité de soins et d'animation de la commune V (USAC CV).

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

Age (années)	Effectif	Pourcentage (%)
≤29	18	40,0
30-44	25	55,6
≥45	2	4,4
Total	45	100

Cinquante six pour cent de nos patients se trouve dans la tranche d'âge 30-44, avec une médiane d'âge de 31 ans et des extrêmes de 8 et 56 ans.

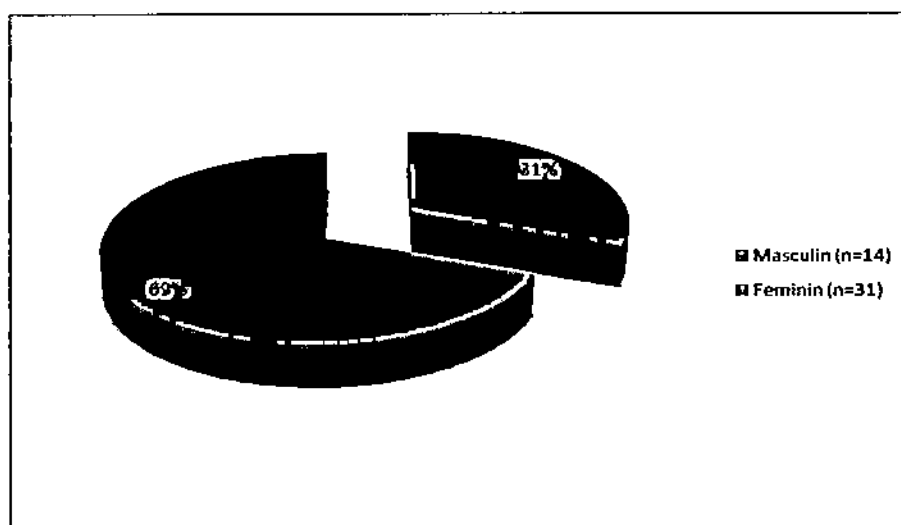


Figure 19 : Répartition des patients en fonction du sexe

Le sexe ratio est 2,33 en faveur des femmes.

**Tableau X : Répartition des patients en fonction du service demandeur**

SPEC	Effectif	Pourcentage (%)
Gastro/HGT	11	24,4
Ped/HGT	8	17,8
CESAC	18	40,0
Med Int/HPG	1	2,2
USAC C V	7	15,6
Total	45	100

La majeure partie de nos patients a été recrutée au CESAC soit 40%.

**Tableau XI: Répartition des patients en fonction du taux de lymphocyte T CD4<sup>+</sup>**

CD4+/mm <sup>3</sup>	Effectif	Pourcentage (%)
<200	32	71,1
200-350	8	17,8
>350	5	11,1
Total	45	100

Soixante onze pour cent de nos patients avait un taux de CD4+ inférieur à 200 cellules/mm<sup>3</sup>

**Tableau XII : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique (CVp) en copie/ml**

CV en cp/ml	Effectif	Pourcentage (%)
≤50 000	14	31,1
50 000-100 000	7	15,6
<b>100 000-500 000</b>	<b>19</b>	<b>42,2</b>
≥500000	5	11,1
Total	45	100

Quarante deux pour cent de nos patients avait une CV supérieure ou égale à 100 000 copies/ml.

**Tableau XIII : Répartition des patients en fonction des traitements antirétroviraux de 1<sup>ère</sup> ligne**

Traitement	Effectif	Pourcentage (%)
3TC/D4T/NVP	18	40,0
3TC/AZT/NVP	8	17,8
3TC/AZT/EFV	6	13,3
3TC/D4T/EFV	7	15,6
3TC/D4T/IDV	3	6,7
DDI/D4T/IDV	1	2,2
DDI/D4T/NVP	2	4,4
Total	45	100

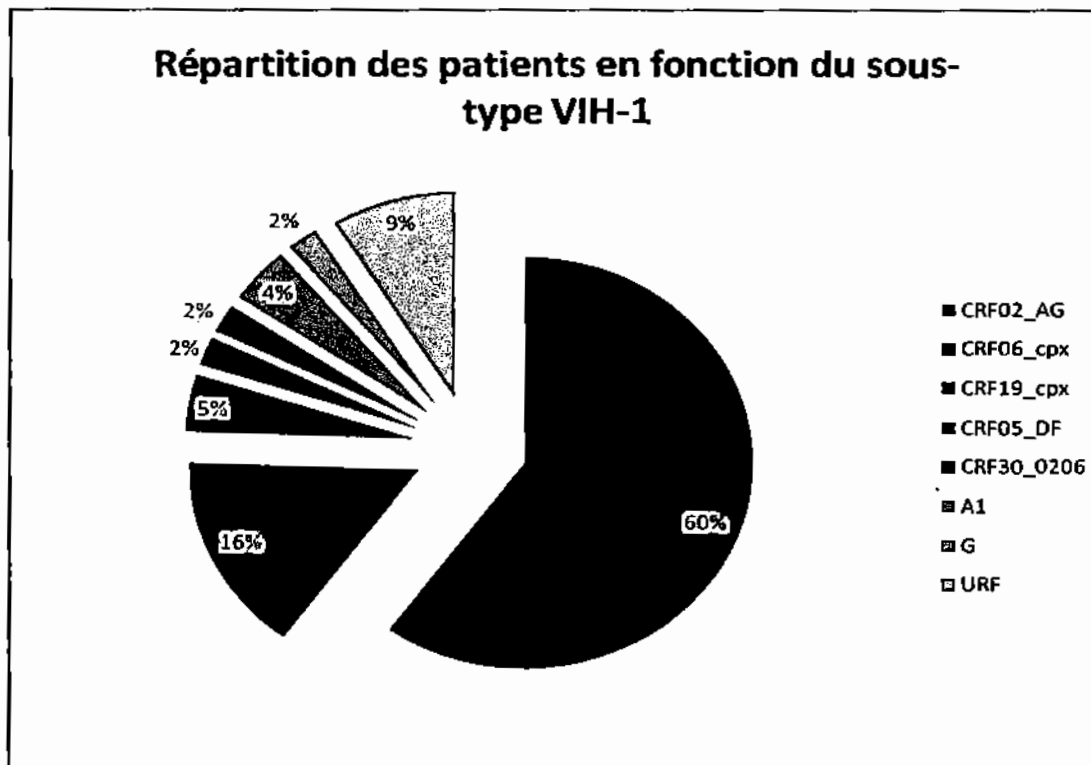
Quarante pour cent de nos patients ont reçu la Triomune® (3TC+d4T+NVP) comme traitement antirétroviral de première ligne.

**Tableau XIV : Répartition des patients en fonction des traitements antirétroviraux de 2<sup>ème</sup> ligne**

Traitement	Effectif	Pourcentage (%)
3TC/TDF/LPV/r	6	13,3
3TC/TDF/IDV/r	1	2,2
3TC/AZT/LPV/r	6	13,3
ABC/TDF/LPV/r	6	13,3
3TC/D4T/LPV/r	1	2,2
ABC/DDI/LPV/r	20	44,4
3TC/ABC/LPV/r	2	4,4
ABC/DDI/IDV/r	3	6,7
Total	45	100

La combinaison de traitement antirétroviral ABC+DDI+LPV/r représentait 44,4% des traitements prescrits en seconde ligne chez nos patients.





**Figure 20: Répartition des patients en fonction du sous-type VIH-1**

Le CRF02\_AG était le sous type le plus prédominant avec 60% des cas.

**Tableau XV : Répartition des patients en fonction des mutations de résistance aux traitements antirétroviraux chez les 43 patients séquencés**

Mutations	Molécules résistantes	Effectif	Pourcentage
<b>Mutations majeures aux INTI</b>			
M184V	3TC, FTC	21	48,8
T215Y/F	AZT, D4T	14	32,5
V75M	D4T	4	9,3
M184V+Y215F	ABC, 3TC, D4T, AZT, FTC	11	25,6
<b>Mutations mineures aux INTI</b>			
M41L+T69D, E44D, K219Q, L210W	DDI, TDF,	3	7
TAMs1 (M41L, L210W, T215Y)	AZT, D4T, ABC,	3	7
TAMs2 (D67N, K70R, T215F, K219Q)	AZT, D4T, ABC, TDF	4	9,3
<b>Mutations aux INNTI</b>			
K103N/S	NVP, EFV	6	14
K101E	NVP, EFV, ETV	3	7
L100I	NVP, EFV, ETV	2	4,6
Y181C	NVP, EFV, ETV	5	11,6
G190A	NVP, EFV, ETV	4	9,3
A98S	NVP, ETV	2	4,6
V106I	EFV, NVP, ETV	2	4,6
V108I		2	4,6
M230L	EFV, NVP, ETV	2	4,6
E138K	Intermédiaire à ETV	1	2,3
Y188L	EFV, NVP	1	2,3
<b>Mutations majeures aux IP</b>			
I84V	IDV	6	14
V82F	IDV	5	11,6
L76V	LPV/r	4	9,3

L90M	IDV, SQV, ATV	3	7
M36I, H69K, L89M	TPV	30	69,7
Mutations mineures aux IP			
M46I, K20I/M, L90M, L63P, A71V, I54V, L10I/V,	IDV, SQV, APV, LPV/r	4	9,3

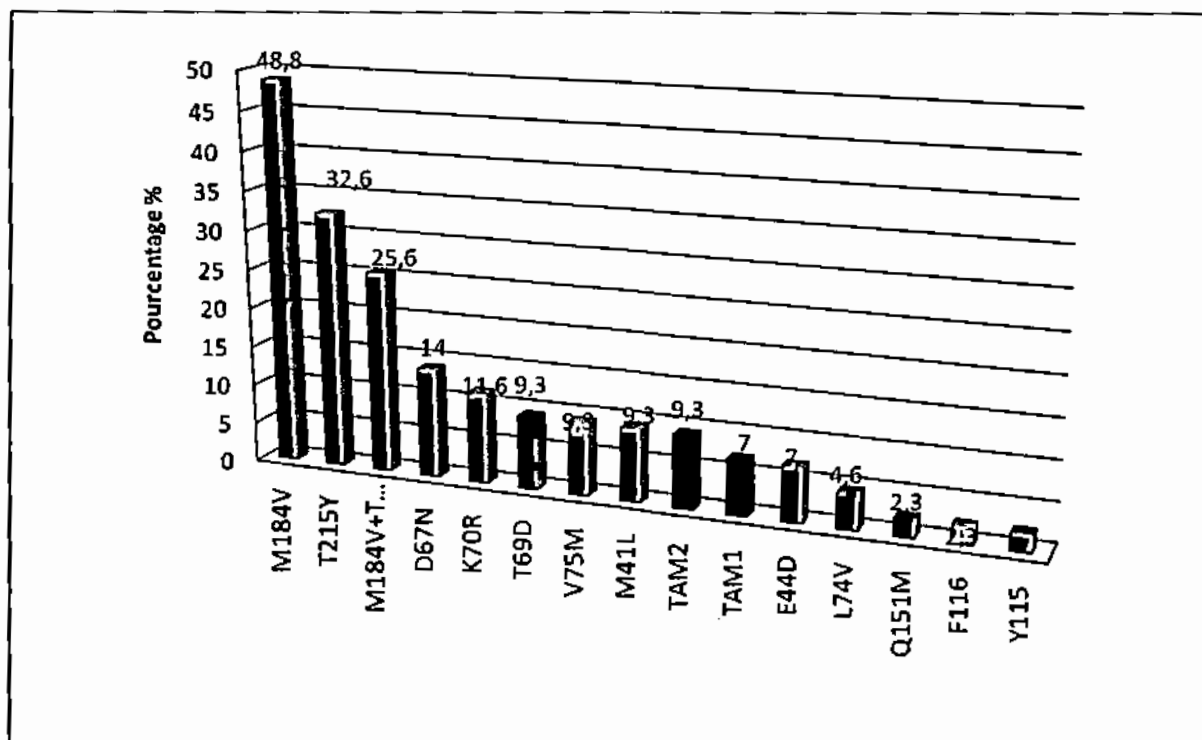
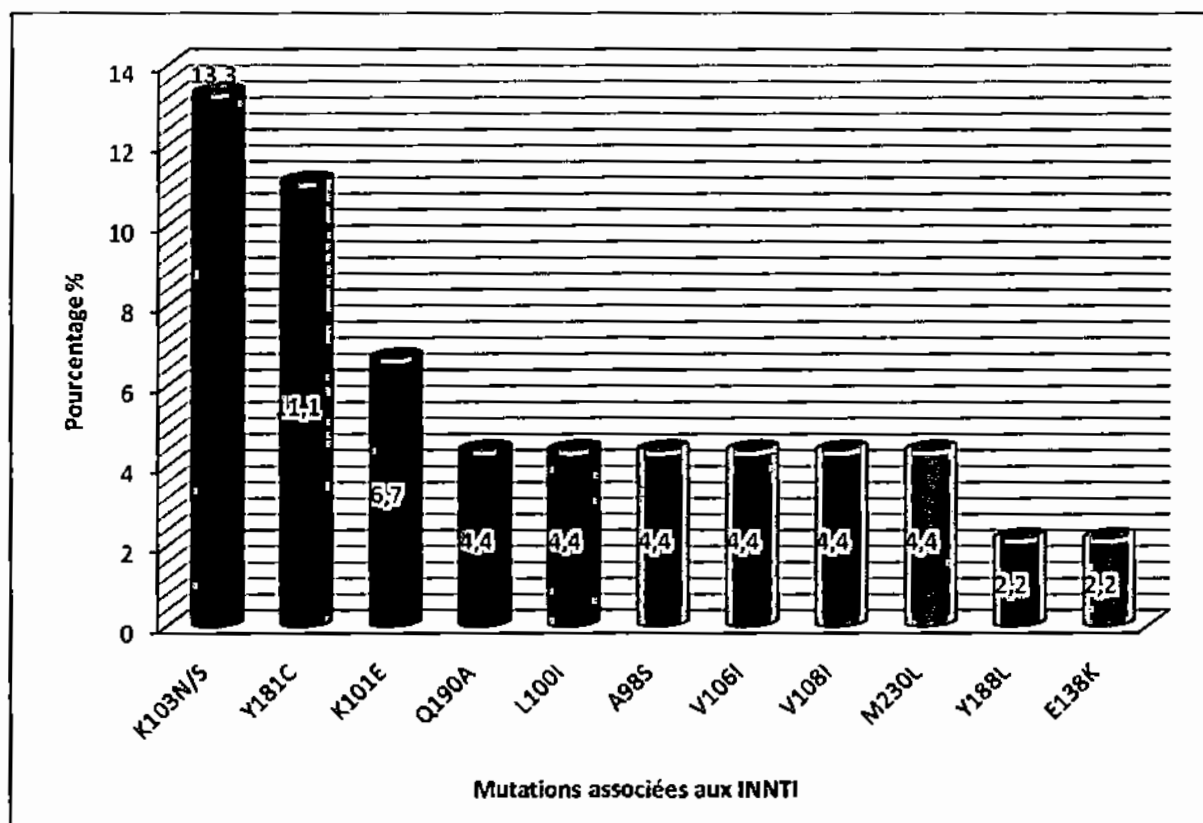


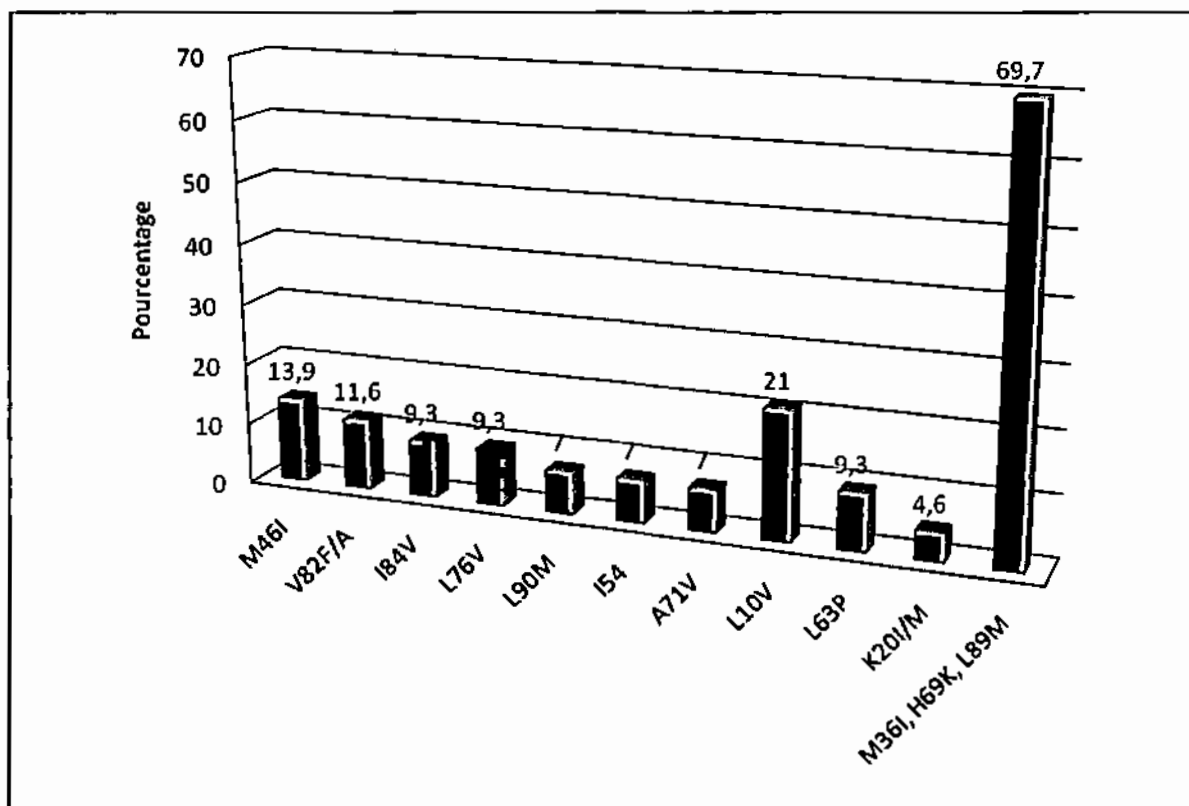
Figure 21 : Fréquence des mutations associées aux INTI

La mutation M184V conférant la résistance aux 3TC, FTC était la plus fréquente des mutations associées aux INTI, suivi de la T215Y/F qui rend résistant aux analogues de la Thimidyne.



**Figure 22: Fréquence des mutations associées aux INNTI**

La mutation K103N/S était la plus fréquente des mutations associées à la résistance aux INNTI.



**Figure 23: Fréquence des mutations associées aux IP**

Les mutations V82F/A et L76V étaient les plus importantes et rendent résistant respectivement à l'Indinavir et au Lopinavir.

Tableau XVI : Répartition des mutations associées aux INTI en fonction des sous types

Mutations	CFR02_A G	CRF06_cp x	CRF19_cp x	A1	AUTRES	Total
M184V	11(52,4)	4(19)	2(9,5)	1(4,8)	3(14,3)	21
T215Y	9(64,3)	2(14,3)	0	1(7,1)	2(14,3)	14
M184V+T215Y/ F	7(63,3)	2(18,2)	1(9)	1(9)	0	11
TAM1	2(66,7)	0	1(33,3)	0	0	3
TAM2	3(75)	0	0	0	1(25)	4
T69D	2(50)	0	0	0	2(50)	4
Q151M	1(100)	0	0	0	0	1

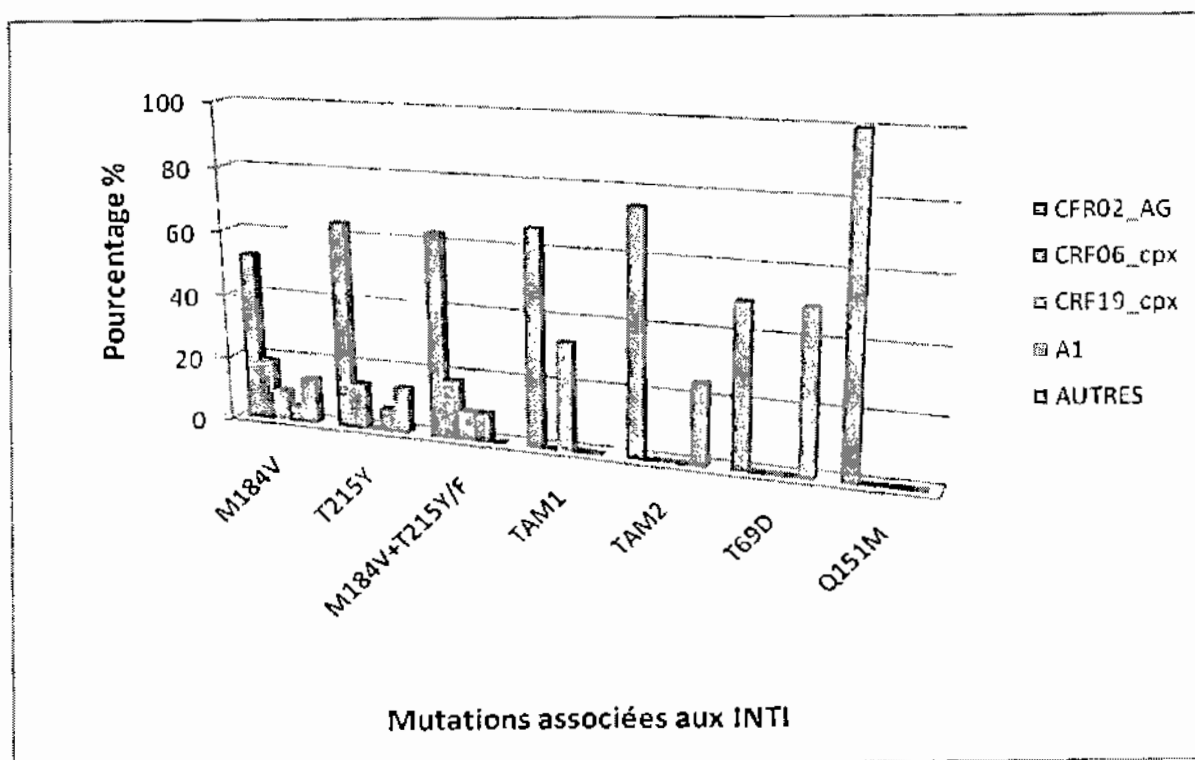
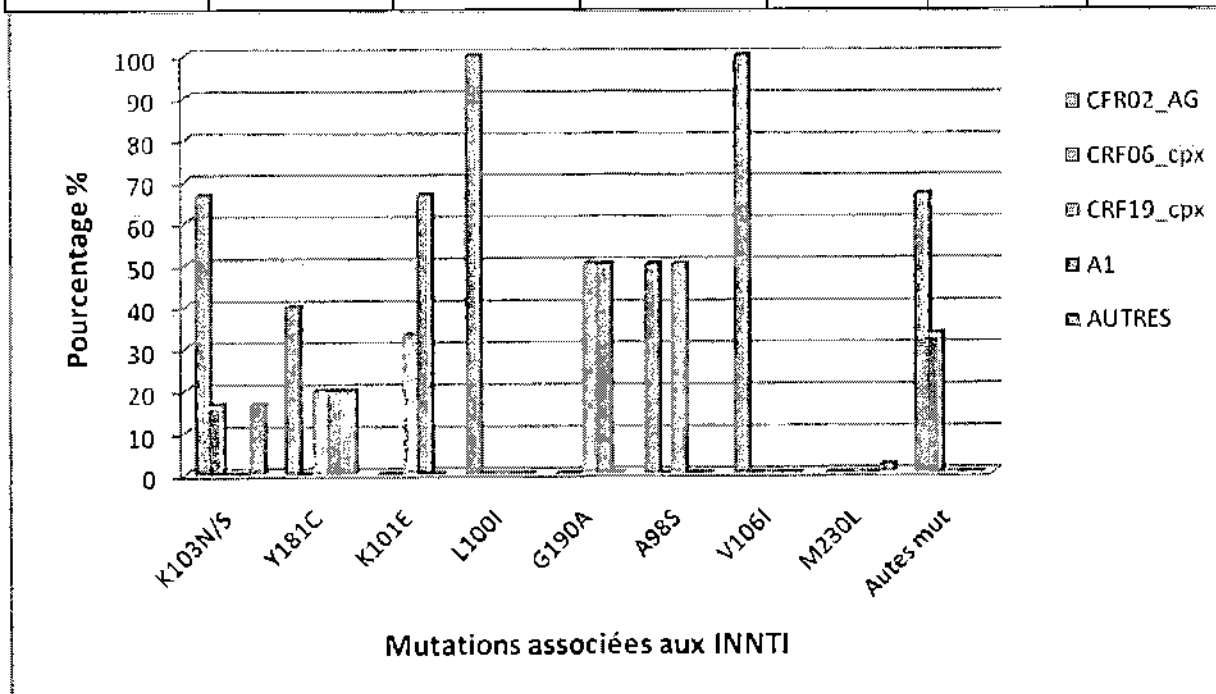


Figure 24 : Fréquence de mutations associées aux INTI.

**Tableau XVII : Répartition des mutations associées aux INNTI en fonction des sous types**

Mutations	CFR02_AG	CRF06_cpx	CRF19_cpx	A1	AUTRES	Total
K103N/S	4(66,7)	1(16,6)	0	0	1(16,7)	6
Y181C	2(40)	0	1(20)	1(20)	1(20)	5
K101E	0	0	1(33,3)	2(66,7)	0	3
L100I	2(100)	0	0	0	0	2
G190A	0	0	1(50)	1(50)	0	2
A98S	1(50)	0	1(50)	0	0	2
V106I	2(100)	0	0	0	0	2
M230L	0	0	0	0	2	2
Autes mut	2(66,7)	1(33,3)	0	0	0	3



**Figure 25 : Fréquence de mutations associées aux INNTI**

Tableau XVIII : Répartition des mutations associées aux IP en fonction des sous types

Mutations	CFR02_AG	CRF06_cpx	CRF19_cpx	A1	AUTRES	Total
L10I	4(44,4)	2(22,2)	1(11,1)	1(11,1)	1(11,1)	9
M36I	3(50)	1(16,7)	2(33,3)	0	0	6
I84V	4(100)	0	0	0	0	4
L76M	3(75)	0	1(25)	0	0	4
V82A/F	3(60)	1(20)	1(20)	0	0	5
L63P	2(50)	0	1(25)	0	1(25)	4
L90M	2(66,7)	1(33,3)	0	0	0	3
I54	1(33,3)	0	0	1(33,3)	1(33,4)	3
Autres mut	6(50)	2(16,7)	2(16,7)	1(8,3)	1(8,3)	12

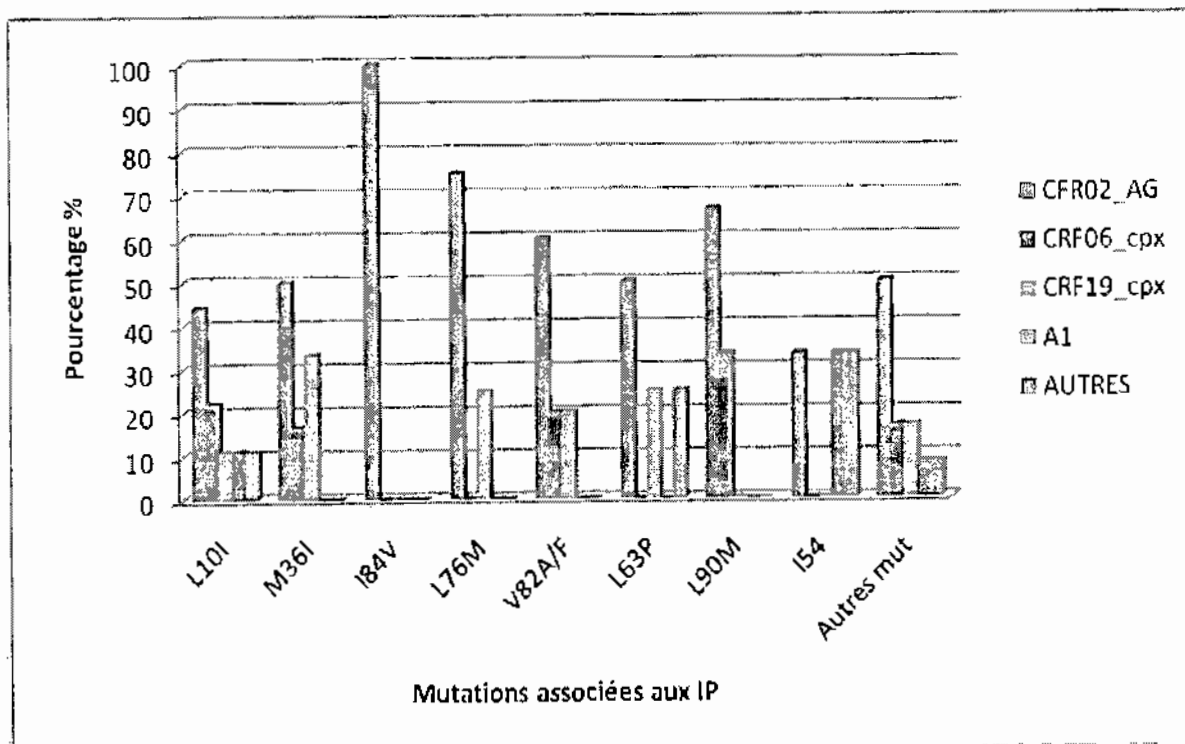


Figure 26: Fréquence de mutations associées aux IP



*Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.*

La plupart des mutations de résistance s'observe chez le sous-type CRF02\_AG, cela est normal du fait que ce sous-type représente 60% des virus chez nos patients.

Autres mutations correspondent à des mutations mineures.

COMMENTAIRES  
ET  
DISCUSSION

## **6. Commentaires et discussion**

### **6.1. Limites de notre étude**

Notre étude fait suite à la mise en place des tests de détection de résistance au Mali, une nouvelle activité dans la prise en charge des PVVIH. Les médecins cliniciens assurant le suivi des patients n'ont pas encore une bonne maîtrise de cet outil indispensable pour le suivi des patients en échec de seconde ligne. Ceci a limité la taille de notre échantillon.

Dans notre étude, nous nous sommes basés seulement sur la mesure de la CV et du taux des cellules CD4+, sans mesurer l'adhésion au traitement antirétroviral chez tous les patients, qui, si elle n'est pas effective, pourrait signifier l'augmentation des CV dans certains cas. Cependant, dans d'autres études l'évolution de la CV et de l'adhésion au traitement doit être soigneusement considérée. Seyler et al. ont montré dans une étude, réalisée chez les patients avec des CV détectables, sans mutation de résistances majeure et chez les patients avec des mutations, et ayant l'expérience d'un changement de régimes ARV, que le taux de succès virologique serait susceptible d'être associé à l'amélioration de l'observance [46].

Le fait que deux échantillons n'ont pas pu être séquencés alors qu'ils avaient des CV détectables, pourrait s'expliquer par une mauvaise qualité des échantillons (plasma), ou par la faible sensibilité de la technique dont la limite de détection de 2000 copies/ml [44]. Contrairement à notre étude, Seylar et al ont montrés qu' une technique maison utilisant un kit Trugène permet d'amplifier et de séquencer les échantillons ayant des charges virales faibles [46].

En Afrique subsaharienne, alors que la mesure des CD4 est de plus en plus disponible, celle de la CV reste encore rarement disponible et les tests de résistance ne sont presque jamais disponibles. Pour éviter la rapide émergence des virus résistant aux ARV sur une large échelle dans les pays en développement, il serait important d'avoir des infrastructures nécessaires pour suivre les réponses biologiques aux thérapies ARV. Dans notre pays, des efforts considérables ont été fournis par les autorités nationales et les partenaires techniques et financiers pour la mise en place des tests génotypiques de résistance. Cela aurait un impact

considérable sur la gestion optimale des traitements ARV et la sélection des mutations de résistance chez les patients. On pourrait espérer que l'utilisation des ARV avec un suivi de la résistance permettra de contrôler rigoureusement le maintien des premières lignes de traitement ARV.

L'usage des ARV dans le traitement de l'infection à VIH a montré une réduction significative de la morbidité et de la mortalité liées au VIH dans les pays industrialisés où la pandémie du VIH-1 sous type B prédomine [45]. Le même effet a également été observé dans les pays en développement comme l'Afrique, où prédomine le sous type non-B. Ces derniers pays regroupent 90% des cas d'infection par le VIH, mais c'est là où les études de résistance aux traitements ARV sont sous estimées. Les sous types non-B ont un polymorphisme beaucoup plus importants, ce qui nécessite d'étudier les mécanismes de résistance de ces virus aux traitements actuellement utilisés.

Le but de cette étude était d'étudier le profil des mutations de résistance aux ARV chez les patients infectés par le VIH-1 de sous type non-B, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de 2<sup>ème</sup> ligne à Bamako. Quarante cinq patients traités, ayant reçu au moins une molécule parmi les trois classes ARV disponibles au Mali. Tous les patients inclus étaient en échec virologique (CVp  $\geq 1000$ cp/ml) de leur traitement de 2<sup>ème</sup> ligne. Ces patients ont été recrutés pendant la période de mars à décembre 2009, et provenaient de cinq sites de prise en charge des personnes vivant avec le VIH de Bamako. Nos patients étaient sous traitement antirétroviral pour une durée médiane de trois ans entre 2002 et 2009. Ceci s'explique par le fait que les traitements antirétroviraux ont commencé en 2001 avec l'IMAARV. Tous les patients avaient une CV et un taux de CD4+ récents (< 15 jours) disponibles sur la fiche de demande du test de génotype de résistance adressé à notre laboratoire.

Sur les 45 patients inclus, nous avons amplifié les gènes de la TI et de la protéase chez 43 patients (95,6%) afin d'identifier les mutations conférant une résistance aux molécules antirétrovirales et de caractériser les sous types VIH-1. Sur les 43 patients, 70% avait au moins une mutation de résistance aux molécules ARV. Et 30% n'avait aucune mutation de résistance à part les polymorphismes, qui confèrent une résistance naturelle au tipranavir. Ces patients ayant des génotypes vierges sont dans deux situations probables, soit ils ne prennent pas les traitements ARV (arrêt de traitement) soit ils n'ont jamais pris de traitement ARV.

## 6.2. La technique utilisée

Les tests génotypiques de résistance sont très importants dans la gestion optimale des traitements ARV, le choix des meilleurs traitements de relais et la limitation du développement de la multirésistance. La PCR utile pour l'analyse des polymorphismes de taille, reste toutefois limitée pour l'exploration des micros hétérogénéités de taille et de séquence. Nous avons de ce fait utilisé, le séquençage et les outils bioinformatiques d'analyse de séquence d'ADN dans notre démarche méthodologique afin de mieux apprécier la diversité génétique et les mutations sur le gène pol, comme la TI et la protéase, dont les rôles sont essentiels dans le traitement ARV. Le kit *Viroseq® HIV-1 genotyping system V2.5* a été utilisé pour analyser des séquences du gène pol du VIH-1.

Ce kit est prêt pour l'emploi, et contient tous les réactifs nécessaires de l'extraction à la réaction de séquence. Ceci explique notre choix de ce kit, et notre étude coïncide avec la mise en place des tests de génotype au Mali. D'autres techniques de séquençage existent, et utilisent des kits et des techniques maisons. Ces dernières sont moins chers que les kits, mais dans un contexte comme le Mali, les commandes de réactifs dans différentes sociétés commerciales seraient fastidieuses. Il serait indispensable néanmoins de mettre en place une technique maison pour assurer les tests pour les nouvelles molécules ARV qui seront disponibles dans les années avenir.

Le site ([www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi](http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi)) a été utilisé pour identifier les sous types de VIH rencontrés chez nos patients.

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

Ces données ont été collectées à l'aide de la fiche de demande du test de génotype adressée au laboratoire. Les femmes représentaient 69% de notre population. Ceci confirme la féminisation de l'infection à VIH en Afrique et particulièrement au Mali où les femmes représentent 1,5% du taux d'infection [10]. Sylla et al, ont aussi trouvé une forte prévalence des femmes dans leur population d'étude au Burkina et au Mali soit 53,35%.

La tranche d'âge 30-44 ans était la plus représentée avec un âge médian de 31 ans et 8 et 56 ans comme extrêmes. Derache et al. ont trouvé un résultat comparable avec 34 ans comme âge médian dans une étude réalisée au Mali [47].

La moyenne de la CV plasmatique était de 120081,68 copies/ml et celle du taux de lymphocyte T CD4+ était 78,1cellules/mm<sup>3</sup>. Les charges virales plasmatiques sont très élevées ceci peut expliquer une inobservance ou des arrêts de traitements ARV chez nos patients. Ces résultats sont comparables à ceux d'autres études [46 ; 47 ; 48], qui ont montré une baisse du taux de CD4+ et de CV élevée chez des patients abritant des mutations de résistance. Majoritairement nos patients sont en profond déficit immunitaire.

Nous n'avons pas suivi l'évolution du taux de CD4+ et de la CV chez nos patients. Nous nous sommes intéressés aux caractéristiques générales des patients au moment de la demande du test génotypique de résistance. Il aurait été intéressant de suivre l'évolution de ces paramètres (CD4 et CV) chez les patients ayant des mutations de résistance. Parce qu'on sait aujourd'hui que les patients qui sont sous traitements antirétroviraux et qui ont des charges virales détectables pendant une longue période accumulent les mutations de résistance aux antirétroviraux dont ils n'ont pas encore reçu. Ceci grâce à la résistance croisée entre les molécules d'ARV surtout les INTI et même les IP. Seylar et al. ont suivi leurs patients avec l'évolution de leur CD4 et CV. Ils ont conclu que la stabilité immunologique chez les patients ayant des mutations de résistance ne peut pas s'appliquer à tous les patients qui ont commencé un traitement ARV. Elle s'applique aux patients qui sont restés en soins thérapeutique durant une médiane de trois ans après initiation du traitement [46]. Notre étude suit cette recommandation.

#### **6.4. Le traitement antirétroviral**

La majorité des patients de cette étude ont été initialement traités à base des combinaisons contenant 2INTI associé à un INNTI (83,33%), ou à un IP (16,67%). La Triomune® (3TC+d4T+NVP) a été prescrit comme traitement de 1<sup>ère</sup> ligne chez 40% de nos patients, et comme alternatif de ce régime des combinaisons telles que, 3TC+AZT+NVP, 3TC+d4T+EFV, 3TC+d4T+IDV. Quant au régime de seconde ligne, la combinaison ABC+DDI+LPV/r était la plus prescrite avec 44,4%.

Des combinaisons 3TC+TDF+LPV/r (13,3%), 3TC+AZT+LPV/r (13,3%), ABC+DDI+IDV/r (13,3%) et 3TC+ABC+LPV/r (6,67%) étaient aussi prescrites comme régime de 2<sup>ème</sup> ligne. Ces résultats reflètent les recommandations de la politique nationale du Mali. Renaud et al ont démontré dans une étude réalisée sur la répartition des premières et secondes lignes des ARV chez les adultes dans les pays à ressources limitées, que la combinaison 3TC+d4T+NVP était prescrit chez 61% de ces patients [60]. En Côte d'Ivoire selon, le programme de prise en charge/pharmacie et santé public 2006, 42% des patients adultes était sous Triomune® comme régime de 1<sup>ère</sup> ligne [61]. Par contre, Sylla et al. ont démontré dans leur étude que la combinaison AZT+3TC+NVP était prédominante qui peut s'expliquer par la politique de prise en charge thérapeutique en cours qui visent maintenant de switcher le d4T à d'autres INTI [48]

#### **6.5. Prévalence des mutations de résistance aux ARV**

Treize patients soit 30% n'avaient aucune mutation de résistance, sauf au niveau de la protéase où des polymorphismes naturels conférant de la résistance au TPV. Six d'entre eux n'étaient pas observant à leurs traitements antirétroviraux. Ils avaient une histoire d'inobservance aux médicaments ou une interruption de traitement. Ceci peut expliquer les fortes CV chez ces patients alors qu'ils n'ont aucune mutation de résistance majeure. Ceci pose la question de la qualité de la mesure de l'observance au traitement ARV. En général, le personnel soignant pose des questions au patient qui peut ne pas dire la vérité par peur de ne

pas être priver des soins prochainement. D'autres facteurs interviennent dans l'inobservance des patients (croyances, distance des services de santé, pauvreté, analphabétisme rupture d'approvisionnement en ARV etc.) [49].

La prévalence des mutations de résistance par classe thérapeutique était; 55,9% avait des mutations de résistance associées aux INTI, 41,9% aux INNTI et 23,2% aux IP. Ces différences de prévalence des mutations de résistance entre les inhibiteurs de la TI et les inhibiteurs de la protéase, pourraient s'expliquer par une exposition plus fréquente et plus longue des virus à la première classe. Elles peuvent également s'expliquer par le fait que nos patients n'ont majoritairement reçu les IP qu'en seconde intention de traitement. Une autre explication serait le fait de la sélection plus rapide des mutations de résistance sous les régimes contenant les INTI et INNTI particulièrement les INNTI ayant une barrière génétique faible à la résistance que les IP. On sait que aujourd'hui que la résistance aux IP est associée à une accumulation de mutation de résistance que les IP. Il faut plusieurs mutations pour rendre résistance un IP comme le Lopinavir par exemple, pour lequel il faut six mutations mineures pour le rendre résistant [3].

D'autres études réalisées chez des patients infectés par le VIH, et en échec de leur traitement malgré qu'ils reçoivent une combinaison de molécules antirétrovirales contenant les trois classes différentes d'ARV (INTI, INNTI et IP), la prévalence de virus porteurs de mutations résistance était de 38% [50].

Cinq de nos patients avaient des virus porteurs de mutations majeures conférant de la résistance à la plupart des molécules antirétrovirales des trois classes disponibles au Mali. Deux d'entre eux avaient une résistance aux nouvelles molécules non disponibles au Mali en occurrence l'etravirine et le darunavir. Les mutations de résistance peuvent survenir en l'absence de tout traitement antirétroviral chez des patients porteurs de virus non B [5]. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de certaines mutations de résistance avant tout traitement ARV ce qui est le cas dans notre étude. Mais aucun patient naïf de traitement ARV ne présentait une résistance intermédiaire à l'Etravirine selon une étude menée sur un échantillon de 726 patients n'ayant jamais reçu de traitement ARV. Ces mutations apparaissent comme un polymorphisme naturel des sous-types non B particulièrement le sous-type CRF02\_AG (Maiga et al, 2009).



La résistance au darunavir, qui est une molécule de la classe des inhibiteurs de la protéase non disponible au Mali peut s'expliquer par la résistance croisée entre les inhibiteurs de la protéase. Nos patients étaient sous lopinavir, et ont accumulé plusieurs mutations ce qui confère au darunavir une résistance intermédiaire.

Ces résultats suggèrent, que nous aurons besoin de nouvelles molécules pour la prise en charge des patients en échec de leur seconde ligne. Des études ultérieures seront nécessaires au Mali sur de large échantillon, afin de suivre l'évolution de la résistance aux antiretroviraux de seconde ligne.

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

Parmi les patients ayant eu des tests génotypiques de résistance, les mutations associées à la résistance aux INTI plus fréquentes étaient : la M184V 48,8% (21/43), T215Y/F 32,6% (14/43) et la mutation mineure la M41L 13,9% (6/43). Deux patients avaient des TAMs1 et trois autres avaient des TAMs2. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans une étude chez les patients en échec virologique (CV > 500 copies/ml) des traitements antirétroviraux de première ligne réalisée au Mali et au Burkina Faso sur un échantillon de 801 patients (M184V=83% ; 33%=T215Y/F). Marcelin et al, Sylla et al, Debra et al (en Cote d'Ivoire), ont aussi trouvé des résultats comparables, mais avec des différences sur la prévalence des TAMs, qui pourrait s'expliquer par la petite taille de notre échantillon.

#### **6.5.2. Prévalence de mutations de résistance aux INNTI**

La K103N/S, était la mutation la plus prédominante parmi celles associées aux INNTI 13,9% (6/43) suivi de l'Y181C 11,6% (5/43). D'autres mutations associées aux INNTI étaient présentes comme la K101E, L100I, G190A et A98S. Cependant Debra et al ont trouvé la K103N/S chez 95%, mais était suivi de la P225H (12%) [51]. Nous n'avons pas trouvé cette mutation P225H dans notre population d'étude. Le pourcentage faible des mutations associées à la résistance aux INNTI s'explique par le fait que 30% de nos patients étaient inobservés et ne présentaient aucune mutation de résistance.

### **6.5.3. Prévalence des mutations de résistance aux IP**

Les plus fréquentes mutations associées aux IP étaient la M46I 13,9% (6/43), suivi de L90M, I84V, M46I, K20M/I, tous avec la même proportion 21,4%(6/28). Nadembega et al ont également trouvé que la V82V/F était la plus prévalente des mutations associée à la résistance aux IP[52]. Les mutations L90M et V82F ont été identifiés par Debra et al, ils ont trouvé que la L90M était la plus prévalente des mutations associées à la résistance aux IP [51]. D'autres mutations comme la L76V conférant à elle seule un haut niveau de résistance au lopinavir a été retrouvé chez des patients [34]. 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 [5].

### **6.6. Diversité Génétique et sous-type VIH**

Le recombinant CRF02\_AG était le sous-type le plus prédominant dans notre population d'étude 62,7% (27/43), suivi du CRF06\_cpx 16% (7/43). Des études réalisées en Afrique Subsaharienne ont toutes trouvé que le CRF02\_AG est, en général, prédominant en Afrique de l'Ouest [8 ;48 ;51]. Des études réalisées au Mali ont montré que le sous-type CRF02\_AG est le sous-type le plus prédominant au Mali avec 74% chez les patients non traités (Derache et al 2008) [5] . Elle est aussi prévalant au Cameroun (Afrique Central ) ainsi qu'en Djibouti en Afrique de l'Est [53, 54].

Le sous type CRF06\_cpx semble être le second sous type prédominant en Afrique de l'Ouest [55, 56]. Sylla et al, confirme la présence du CRF06\_cpx dans une étude réalisée au Mali et au Burkina Faso. Nous avons observé des patients avec des sous types A-1, G, CRF05\_DF, CRF30\_0206, le CRF19\_cpx et quatre patients que nous n'avons pas pu classer et nommés URF. Les URF sont des virus recombinés entre plusieurs souches. De plus en plus on en rencontre dans les études menées en Afrique [47, 48].

### **6.6. Prévalence de mutations selon le sous type**

La mutation K103N/S était prédominante dans le sous type CRF02\_AG, comme observé par Sylla et al (50%) [48]. Dans notre contexte, ceci peut être dû à la forte prévalence du CRF02\_AG.

Les caractéristiques de TAMs2 étaient plus fréquentes chez nos patients abritant le CRF02\_AG que les TAMs1. Sylla et al, ont eu une prévalence des TAMs2 chez des sous types CRF02\_AG, mais cette différence n'est pas significative, et serait surtout due à la taille de notre population d'étude [48]. On connaît beaucoup plus le profil d'apparition des mutations « TAMs » chez les sous-types B. Plusieurs études ont montré que les TAMs1 sont beaucoup plus fréquemment rencontrées chez les virus de sous-type B que les TAMs2. En raison des tendances à long terme de l'usage séquentielle des ARV, expliquant l'évolution des TAMs au fil du temps ou éventuellement à un avantage conféré par l'aptitude de certaines mutations telles que : T215Y ou L210W [3].

Nos données montrent que beaucoup de nos patients avaient des mutations de résistance conférant une résistance aux différentes molécules antirétrovirales de 1<sup>ère</sup> ligne. Ceci peut avoir des conséquences importantes sur les options de traitements ultérieures et les régimes de 2<sup>ème</sup> ligne qui sont devenus de plus en plus disponibles pour les patients des pays à ressources limitées, mais surtout pourrait compromettre l'utilisation des nouvelles molécules antirétrovirales.

De toute évidence, ces résultats nécessitent la mise en place d'une stratégie d'étude dans le temps et dans l'espace pour évaluer les populations virales, la résistance aux ARV et leurs impacts sur les plans clinique et thérapeutique. Des études précédentes ont démontré qu'il y a une dynamique évolutive: en 1985, le VIH-2 était prédominant au Mali, en 1995 le sous type A du VIH-1 était prédominant, et actuellement l'émergence de formes recombinantes CRF02\_AG, CRF06\_cpx et CRF09\_cpx est observée [47; 57; 58].

Bien que la comparaison de la prévalence des mutations de résistance entre les différentes études soit limitée par beaucoup de facteurs, tels que l'expérience des traitements (hétérogènes ou pas), les différences de durée de l'infection à VIH parmi les participantes des études, et la disponibilité des médicaments ARV dans la population d'étude. Cette étude marque la différence avec les études antérieures car pour la première fois à notre connaissance, une étude sur les échecs virologiques en seconde ligne est réalisée dans un contexte africain, le Mali. La particularité de cette étude réside au fait que toute l'étude a été complètement faite à Bamako sans envoi d'échantillons à technique en Europe ou aux Etats Unis comme il est observé dans plusieurs études décrivant la résistance dans les pays africains [47 ; 48].

CONCLUSION

RECOMMENDATIONS

## **7. Conclusion**

Nous avons mené une étude chez 45 patients en échec virologique de leurs traitements antirétroviraux de seconde ligne. Ces patients provenaient essentiellement de cinq sites de prise en charge à Bamako.

Nos résultats montrent que, malgré l'usage relativement récent des ARV (2001), nos patients en échec de seconde ligne présentent une prévalence de 55,9 % de mutations associées aux INTI, 41,9% aux INNTI et 23,2% aux IP. Le recombinant CRF02\_AG était le sous type prédominant (60%), suivi du CRF06\_cpx (16%). L'âge et sexe semblent être non associés avec la résistance aux médicaments. En effet cette étude montre la difficulté de la gestion des patients en échec virologique de leur traitement sans monitoring biologique.

Dans cette étude, notre population était limitée aux patients de Bamako, une vaste enquête dans toutes les régions du pays avec un nombre suffisant d'échantillon permettra d'améliorer nos connaissances sur la résistance aux ARV et la diversité génétique du VIH-1 au Mali.

## **8. Recommandations**

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

### **Aux cliniciens**

Une meilleure organisation de la gestion des patients en termes de traitement antirétroviral, de suivi biologique et de suivi de l'observance au traitement antirétroviral.

### **Aux pharmaciens et Biologistes**

Prévenir l'émergence de la résistance aux ARVs en informant les patients sur la nécessité d'une bonne adhésion à leur régime de traitement antirétroviral,

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

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

### **Aux partenaires techniques et financiers**

Appuyer les laboratoires et les institutions de recherche par :

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

# REFERENCES

# BIBLIOGRAPHIQUES



## 9. Références bibliographiques

1. ONUSIDA. ONUSIDA-Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA. 2009. [www.unaids.org](http://www.unaids.org)
2. Professeur Pierre Aubry. Infection par le VIH/SIDA et tropiques. *Medecine Tropicale Actualités 2008*, [medecinetropicale.free.fr/enseignement.html](http://medecinetropicale.free.fr/enseignement.html), consulté le 10/03/2009
3. Recommandation du groupe d'experts Pr. P Yeni. Prise en charge médicale des personnes vivants avec le VIH. *Médecine-Sciences Rapport 2008*, Flammarion: Chapitre 5, 13.
4. Ministère de la santé, Politique et protocoles de la prise en charge antirétrovirale du VIH/SIDA, Mali, 2008.
5. Derache A. Etude des bases moléculaires de la résistance du VIH-1 de sous type non-B aux ARV, Thèse Doctorat (PhD) virologie, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 2009.
6. Marcelin AG, Jarrousse B, Derache A, Ba M, Dakouo ML, Doumbia A, *et al.* HIV drug resistance after the use of generic fixed-dose combination stavudine/lamivudine/nevirapine as standard first-line regimen. *Aids* 2007; **21**:2341-2343.
7. Centers for Disease Control and Prevention, Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi Sarkoma and opportunistic infection. *N Engl J Med* 1982; **306**:248-252.
8. Roquebert B, Damond F, Brun-Vezinet F, Descamps D. [HIV genetic diversity and its consequences. *Pathol Biol Paris* 2009; **57**:142-148.
9. Samake S., Traore SM., Ba S., *et al.* Enquête Démographique et de Santé Mali-IV, EDS-M, 2006.
10. Integrated Sexually transmitted diseases prevalence and Behavioral Survey in Mali, (ISBS), 2006.
11. Luc Montagnier, Barre-Sinoussi F. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220**:868-871.
12. Jean Marie Huraux HA, Jean Claude Nicolas *et al.* Traité de virologie médicale. *Estem* 2003:699.

13. Barre-Sinoussi F. Virologie fondamentale de l'infection à VIH. *VIH* 1998; Dion:p6-20.
14. Plantier JC, Gueudin M, Damond F, Braun J, Mauclore P, Simon F. Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; **33**:1-7.
15. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; **15**:871-872.
16. HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRFs).  
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>, 2009.
17. McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS. HIV-1 genetic diversity. *Aids* 1996; **10**:S13-20.
18. Coulibaly K. Genotypage et exploration du polymorphisme nucléotidique de CCR5, récepteur de chimiokines et corecepteur majeur du VIH-1, à Bamako. Thèse de médecine, Université de Bamako 2005. **05-M-38**
19. Barré-Sinoussi F. Virologie fondamentale de l'infection VIH. *VIH* 2007, Paris, Dion 2007; p3-9.
20. Maiga AI. Barrière génétique des inhibiteurs de l'intégrase (IN) entre les VIH-1 sous-types B et CRF02\_AG, MASTER RECHERCHE SIGNALISATION ET SYSTEMES INTEGRÉS EN BIOLOGIE, ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES PARIS, 2007.
21. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001; **26**:13-33.
22. Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* 1997; **388**:230-231.
23. Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 1998; **273**:33414-33422.
24. Wiegers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1998; **72**:2846-2854.
25. World Health Organisation (WHO). Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescent in resource-limited setting: Recommendations for public health approach, July 2006.
26. Calvez V, Gautheret-Dejean A, Marcelin AG. Virologie médicale et infection VIH. *VIH* 2007, 6<sup>e</sup> édition, Paris; Doin; p11-20.
27. Tours University. Cours, Technique de biologie moléculaire. 2002.

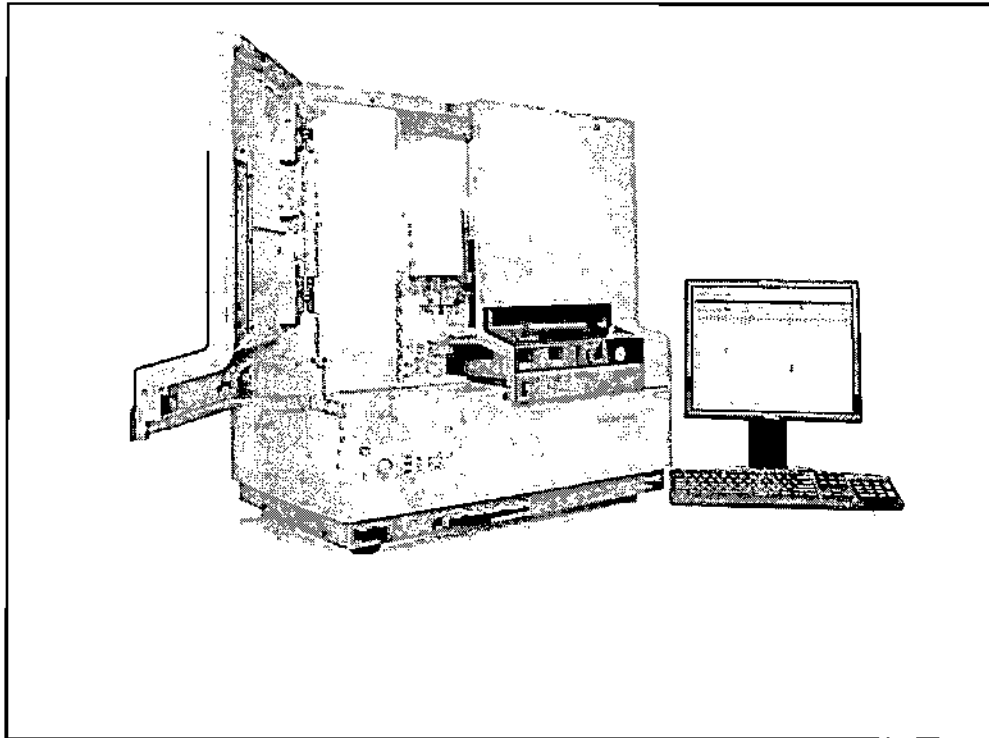
28. Génétique Gde. Les outils de génétique moléculaire. [http://genet.univ-tours.fr/fichiers\\_de\\_base/gen001300.HTM](http://genet.univ-tours.fr/fichiers_de_base/gen001300.HTM) 2002.
29. Dembele D. Cours de bioinformatique. IGBM, CNRS 2005, Strasbourg France.
30. Descamps D, Perrin L, V. Calvez. Prise en charge du traitement antirétroviral. *Traité de virologie de Jean Marie Huraux*, Edsteim, Paris 200; p345-357.
31. Katlama Ch, Pialoux G, Girard P.M. Traitement antirétroviraux. *VIH* 2007, Dion 335-369.
32. Mémento Thérapeutique du VIH/SIDA en Afrique. Dion 2009.
33. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, *et al.* Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *Aids* 2002;16:209-218.
34. Françoise Brun-Vénizet Descate D. Résistance aux antirétroviraux. *VIH* 2007, Paris, Doin; p399-417.
35. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; **350**:1023-1035.
36. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, *et al.* A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2003; **17**:F1-5.
37. Maga G, Amacker M, Ruel N, Hubscher U, Spadari S. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. *J Mol Biol* 1997; **274**:738-747.
38. Velazquez-Campoy A, Vega S, Fleming E, Bacha U, Sayed Y, Dirr HW, Freire E. Protease inhibition in African subtypes of HIV-1. *AIDS Rev* 2003; **5**:165-171.
39. Mahalingam B, Louis JM, Reed CC, Adomat JM, Krouse J, Wang YF, *et al.* Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur J Biochem* 1999; **263**:238-245.
40. Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, *et al.* Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *Aids* 1999; **13**:2349-2359.
41. Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 1998; **72**:986-993.
42. Moncunill G, Armand-Ugon M, Pauls E, Clotet B, Este JA. HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro. *Aids* 2008; **22**:23-31.

43. Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirden M, *et al.* Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:1351-1358.
44. Manuel Viroseq. The European HIV Drug Resistance Guidelines Panel. 2006.
45. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; **338**:853-860.
46. Seyler C, Adje-Toure C, Messou E, Dakoury-Dogbo N, Rouet F, Gabillard D, *et al.* Impact of genotypic drug resistance mutations on clinical and immunological outcomes in HIV-infected adults on HAART in West Africa. *Aids* 2007; **21**:1157-1164.
47. Derache A, Traore O, Koita V, Sylla A, Tubiana R, Simon A, *et al.* Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir Ther* 2007; **12**:123-129.
48. Sylla M, Chamberland A, Boileau C, Traore HA, Ag-Aboubacrine S, Cisse M, *et al.* Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02\_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. *Antivir Ther* 2008; **13**:141-148.
49. Coulibaly MS., Oumar AA., Ag Aboubacar S., *et al.* La tolérance clinique et biologique de la nevirapine chez les malades du sida sous traitement à l'hôpital du point G. *Mali Med* 2007.
50. Gallego O, de Mendoza C, Perez-Elias MJ, Guardiola JM, Pedreira J, Dalmau D, *et al.* Drug resistance in patients experiencing early virological failure under a triple combination including indinavir. *Aids* 2001; **15**:1701-1706.
51. Hanson DL, Adje-Toure C, Talla-Nzussouo N, Eby P, Borget MY, Kouadio LY, *et al.* HIV type 1 drug resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**:489-495.
52. Nadembega WM, Giannella S, Simpoire J, Ceccherini-Silberstein F, Pietra V, Bertoli A, *et al.* Characterization of drug-resistance mutations in HIV-1 isolates from non-HAART and HAART treated patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2006; **78**:1385-1391.

53. Carr JK, Salminen MO, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* 1998; **247**:22-31.
54. Papathanasopoulos MA, Hunt GM, Tiemessen CT. Evolution and diversity of HIV-1 in Africa--a review. *Virus Genes* 2003; **26**:151-163.
55. Ouedraogo-Traore R, Montavon C, Sanou T, Vidal N, Sangare L, Sanou I, *et al.* CRF06-cpx is the predominant HIV-1 variant in AIDS patients from Ouagadougou, the capital city of Burkina Faso. *Aids* 2003; **17**:441-442.
56. Montavon C, Toure-Kane C, Nkengasong JN, Vergne L, Hertogs K, Mboup S, *et al.* CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **29**:522-530.
57. Peeters M, Koumare B, Mulanga C, Brengues C, Mounirou B, Bougoudogo F, *et al.* Genetic subtypes of HIV type 1 and HIV type 2 strains in commercial sex workers from Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; **14**:51-58.
58. Montavon C, Bibollet-Ruche F, Robertson D, Koumare B, Mulanga C, Esu-Williams E, *et al.* The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various West African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; **15**:1707-1712.
59. Barbara S. Taylor, M. D., Magdalena E. Sobieszczyk, M. D., M. P. H., *et al.* The challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *N Engl J Med* 2008; **358**:1590-602.
60. Renaud-Thery F, Nguimfack BD, Victoria M, Lee E, Graaff P, Samb B *et al.* Use of antiretroviral therapy in resource-limited countries in 2006: distribution and uptake of first and second-line regimens. *AIDS* 2007 ; **4**:S89-95.
61. Programme National de prise en charge des PVVIH, Côte d'Ivoire, 2004

# ANNEXES

# Séquenceur ABI 3130



## Exemple de séquences d'un patient

```
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
|-----|
|Q10.01d1 Wed Feb 20 17:14:38 GMT+01:00 2002. 1308 bases.
|-----|
MNTCAHAWNHCTCTTTGGCAACGACCCATCGTCACRATAAAGATAGGGGG
GCAACTAAAGGAAGCTCTAATAGATACAGGAGCAGATGATACAGTARTAG
AAGAARTGGATTTGYCAGGAARATGGAAAMCCAAAAATAATAGGGGGGAAAT
GGAGGTYTTGTCAAAGTAAGHCAGTATGATCAGGTACCCATAGAAATCTG
CGGACATAAAGYTGTTAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGCCAACA
TAATTGGAAAGAAATCTGTTGACCCAGATTGGCTGCACCTTAAAAATTTCC
ATUAGTCTWTKGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGG
CCCAAGACTTAAACAATGCCATTGMCAGAAGAAAAAATRAAARCATTAG
TAGAATTTGTACAGAATTGGAAAAATGAGCAAAAAATTTCAAAAAATTCGG
CCTGAAAAATCCATACAACTACTCCAGTATTTGTCTAARAGRAAAAAAGACAG
TTCTAGTGCTAAATGGAGAAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACCTAATAAGA
GAACTCARGATTTTTGGGAAGTTCAACTAGGAATACCACATCCTGCAGGG
TTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTT
TTCARTTCCCTTAKATRAAGACTTCAGGAAGTATACTGSAATTTACCATAC
CTAGTATAAACAATGAGACACCAGGATTTAGATATCAGTACAAATGKRCTT
CCACAGGGATGGAAAGGATCACCCAGCAATATTYCAATGKAGCATGACMAA
AATCYTARAGCCTTTTTGAAAAACAARACCCAGAGATAGTTATCTACCAAT
ACGTGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAATAGGGCCAGCATAGA
ACAAAAATWGAGGAATTAAGACAACATCTGTTAAAGTGGGGATTTTACAC
ACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCWTTGGATGGGGTATG
AACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAA
GACAGCTGGACTGTCAAATGACATACAAAAGTTAGTGGGAAAAATTTGAATTG
GCCAAGTCAGATTTATCCAGGGATTAARAGTAAAGCAATTATGTAAACTCC
TTAGGGGARCCAAAGCCTAACAGAAAGTAAATCCACTAACAGAAAGAAAGCA
GAGCTAGAAATGGCAGAAAAACAGGGAGATTCTAAAAAGAACCCAGTGCATGG
GGTATATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAAAAGCAGG
AGCRAAGG
```

Exemple de rapport de génotype de résistance d'un patient

Nom	Date échantillon	09.03.2009	Sci. demandeur	AUTRE SERVICE
Prénom	Nature du prélèvement	Plasma	Prescripteur	BAMAKO
Date naissance	No dossier	09110091	Protocole	
ID num. patient	Sous-type	DS_AG		

**Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI)**

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Epivir® / Emtriva® / Lamivudine / Emtricitabine (3TC, FTC)	184V	3		R - Resistance
Zidovudine® Abacavir (ABC)	87N, 70R, 184V, 215F, 219E	1		S - Susceptible
Zalcitabine® Didanosine (DDI)	87N, 70R, 74M, 216F, 219E	2		R - Resistance
Videx® Didanosine (DDI)	70R, 184V, 215F, 219E	1		S - Susceptible
Viread® Tenofovir DF (TDF)	27N, 88N, 256F	2		I - Possible resistance
Renvir® Zalcitabine (ZDV)	87N, 70R, 216F, 219E	3		R - Resistance

**Non-Nucleoside Reverse transcriptase Inhibitors (NNRTI)**

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Etravirine® Etravirine (EFV)	100I, 103N	3		R - Resistance
Etravirine® Etravirine TMC125 (ETV)	100I	1		S - Susceptible
Viramate® Nevirapine (NVP) *	100I, 103N	3		R - Resistance

**Protease Inhibitors (PI)**

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Reyataz® / Norvir® 300/100 Atazanavir / Ritonavir (ATV, RTV)	48I, 84V	1		S - Susceptible
Prezista® / Norvir® 500/100 Darunavir / TMC114 / Ritonavir (DRV, RTV)	47V, 76V, 84V	2		I - Possible resistance
Orkambi® / Kaletra® (D)	88I, 48I, 71V, 84V	3		R - Resistance
A component of Kaletra® Lopinavir (LPV)	48I, 88R, 71V, 76V, 84V	3		R - Resistance
Videx® / Norvir® 100/100 Zalcitabine / Ritonavir (ZDV, RTV)	88I, 88R, 88T	3		R - Resistance
Aplisyn® / Norvir® 500/200 Tenofovir / Ritonavir (TFV, RTV)**	50I, 62V, 84V	2		I - Possible resistance
Aplisyn® / Norvir® 500/200 Tenofovir / Ritonavir (TFV, RTV)**	88I, 88R, 88T	3		R - Resistance
Telzir® / Norvir® 750/100 Fosamprenavir / Ritonavir (fosAPV, RTV)	88I, 47V, 82V, 84V	1		S - Susceptible



**Demande de génotype de résistance**



**CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION SUR LE VIH/SIDA - TB**  
 FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO STOMATOLOGIE (FMPOS)  
**UNIVERSITE DE BAMAKO / NIH- USA**  
 TEL: 222 67 88 FAX: 222 75 13 CELL: 675 90 49

Praticiens responsables : Pr. Anatole TOUNKARA et Dr. Almoustapha I. MAIGA

**GENOTYPE de RESISTANCE du VIH-1**

PATIENT		PRESCRIPTEUR		PRELEVEUR
Nom : .....		Nom : .....		Nom : .....
Age : .....		No de poste : .....		Date : .....
Adresse / tél. : .....		Centre/Service : .....		Heure : .....
No. Dossier : .....		.....		
Sexe : M / F				

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

**MOTIF DE LA DEMANDE**

- Primo-infection (Séro-conversion récente)
- Découverte / Naïf (vie) de traitement
- Grossesse :
- Autre à préciser :
- Génotype avant 1<sup>ère</sup> ligne
- Echappement :  1<sup>ère</sup> ligne  2<sup>ème</sup> ligne  
 3<sup>ème</sup> à 5<sup>ème</sup> ligne  > 5 lignes
- Protocole :  non  oui, lequel ? .....
- Statut VIH1  VIH1 + VIH2  VIH2

**RENSEIGNEMENTS :**

Traitement anti-VIH actuel : ..... depuis le : .....

Traitement précédent : ..... du ..... au .....

Fenêtre thérapeutique : du ..... au .....

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

Dernière charge virale : Résultat ..... Date : .....

Dernière valeur CD4 : Résultat ..... Date : .....

Intolérance sévère aux ARV : .....

Co-infection active:  VHC  VHB  TB  Autres : .....

Remarques: .....

**TOUTES MOLECULES ANTIRETROVIRALES PRESCRITES AUPARAVANT (historique) :**

- |                                  |                           |                          |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| p AZT (Retrovir®)                | p Saquinavir (Invirase®)  | p Efavirenz (Sustiva®)   |
| p DDI (Videx®)                   | p Ritonavir (Norvir®)     | p Nevirapine (Viramune®) |
| p 3TC (Epivir®)                  | p Indinavir (Crrixivan®)  |                          |
| p FTC (Coviracil®)               | p Lopinavir /r (Kaletra®) |                          |
| p ABC +/- (Ziagen / Kivexa®)     |                           |                          |
| p D4T (Zerit®)                   |                           | p Autre :                |
| p CBV (Combivir®)                |                           |                          |
| p TZV (Trizivir®)                |                           |                          |
| p TDF +/- FTC (Viread / Truvada) |                           |                          |
| p D4T + 3TC - NVP (Triomune®)    |                           |                          |

## Fiche signalétique

**Nom :** FOFANA

**Prénoms :** Djeneba Bocar

**Nationalité :** Malienne

**Thèse :** Profil des mutations de résistance chez des patients infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leur traitement antirétroviral de seconde ligne à Bamako au Mali.

**Date de soutenance :** 06/02/2010 ; **e-mail :** [djesfof@gmail.com](mailto:djesfof@gmail.com); **Tel :** 00223 76 43 93 14

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la FMPOS de l'Université de Bamako, Mali

### Résumé

Avec la gratuité des traitements antirétroviraux depuis 2004 dans notre pays, l'émergence des virus résistants était à craindre. C'est pour cela que les autorités ont soutenu la création d'un laboratoire permettant la réalisation des tests génotypique de résistance. Nous avons décrit le profil de mutation de résistance chez 45 patients infectés par le VIH-1, en échec virologique de leur de traitement ARV de 2<sup>ème</sup> ligne. Ces patients provenaient de cinq sites de prise en charge de Bamako. Nous avons séquencé 43 patients avec une charge virale détectable. Les séquences obtenues nous ont permis d'identifier les sous-types viraux rencontrés chez ces patients. Nos résultats ont montré que, 55,9% des patients avaient des mutations associées aux INTI avec la M184V comme mutation fréquente ; 41,9% aux INNTI avec une prevalence élevée de la K103N/S et 23,2% aux IP avec une prévalence de la M46I. Le recombinant CRF02\_AG (60%) était le sous-type prédominant, suivi du CRF06\_cpx (16%). D'autres sous types viraux tels que le sous-type A-1, G, CRF05\_DF, CRF30\_0206, CRF19\_cpx et des URF ont été rencontré. Nos résultats montrent la nécessité de renforcer l'adhésion et la continuité des traitements ARV afin d'éviter l'émergence des virus résistants. Ces résultats suggèrent une surveillance de la disponibilité des ARV et la mise en place d'une stratégie d'étude tant dans la capitale Bamako que les capitales régionales comme cela a été pour les traitements antirétroviraux. Ceci permettra de mettre en évidence les sous-types viraux, les mutations de résistance aux ARV et leur implication sur le plan clinique et thérapeutique.

Mots clés: VIH-1, ARV, échec virologique, 2<sup>ème</sup> ligne, mutation et résistance.

## Abstract

Free antiretroviral treatment (ART) for HIV-infected patients in Mali was started in 2004. In the presence of drug therapy, a continual replication of virus could lead to an emergence of drug-resistant variants. Thus concerned authorities in Mali and elsewhere supported the creation of a laboratory to use molecular methods for determining drug-resistant variants from patients infected with HIV-1. Based on this platform, we recruited 45 HIV-1 infected patients from five clinical sites in Bamako, Mali and studied their profile with regards to resistant mutations. All patients had virologic failure with their 2<sup>nd</sup> line ART. Overall, we sequenced samples from 43 patients with detectable viral load. The sequenced genes allowed for identification of a number of recombinant subtypes. Our results showed that 55.9% of patients had mutations associated with NRTI with M184V being the most frequent. Furthermore, 41.9% of patients had mutations associated with NNRTI with a high prevalence of K103N/S while 23.2% mutations were found in PI with a high prevalence of M46I. We further observed that the recombinant CRF02\_AG (60%) was the predominant subtype, followed by CRF06\_cpx (16%). We also identified other viral subtypes including A-1, G, CRF05\_DF, CRF30\_0206, CRF19\_cpx and UFR. Our results show that indeed there are drug-resistant variants associated with HIV-1 infection in Mali. Consequently, there is a need to strengthen national ownership and continuity of ARV therapy to prevent emergence of resistant viruses. Furthermore we suggest that in addition to making ARV easily accessible, a strategy for continuous monitoring could be made available to other regional capitals as well. This will increase our understanding of available drug-resistant variants with clinical and therapeutic implications for long-term effective management of subjects infected with HIV-1.

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.**

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure!**