

Université de Montréal

**Étude de la résistance des sous-types non-B du VIH-1 aux antirétroviraux au Mali**

Par Alpha Haidara

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Docteur ès science (PhD) en virologie et immunologie

Avril, 2012

©, Alpha Haidara, 2012

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Thèse intitulée:

**Étude de la résistance des sous-types non-B du VIH-1 aux antirétroviraux au Mali**

Présentée par:

**Alpha Haidara**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur: Dre Ancuta Petronela

Directrice de recherche: Dre Cécile Tremblay

Membre du jury: Dre Annie-Claude Labbé

Examineur externe: Dr Andrew J Mouland

Représentant du doyen de la FES: Dre Mes-Masson Anne-Marie



## Résumé

Nous avons effectué ce travail afin d'évaluer l'impact d'une utilisation accrue des antirétroviraux (ARV) sur l'émergence de la résistance dans le cadre d'une cohorte de sujets infectés par le VIH-1, enrôlés au Mali pour recevoir la thérapie antirétrovirale.

La première partie de ce travail a évalué la résistance primaire auprès de 101 sujets naïfs aux ARV. Cette étude a démontré que la majorité des sujets (71,3%) étaient infectés par le sous-type CRF02\_AG. La prévalence de la résistance primaire était de 9,9%. Ce chiffre dépasse largement la moyenne de 5,5% observée dans les pays en développement et le seuil des 5% fixé par l'OMS dans le cadre de la surveillance de la résistance. Les mutations associées aux analogues de la thymidine ou « Thymidine-associated Mutations » (TAMs): M41L, D67N, L210W, T215A/Y, K219E liées à la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) ainsi que les mutations K103N, V108I, V179E et Y181C impliquées dans la résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) étaient majoritairement observées. Ces mutations sont compatibles avec les régimes de traitement de première ligne utilisés au Mali, composés de stavudine/lamivudine/nevirapine. Nous n'avons pas trouvé de mutations majeures aux inhibiteurs de protéase (IP), probablement du fait que cette classe d'ARV est rarement utilisée au Mali. Cependant plusieurs polymorphismes au niveau du gène de la protéase, particulièrement L10I et L10V ont été observés à une fréquence très élevée (18,80%).

Compte tenu de ces premiers résultats, une suite logique de ce travail était de savoir comment des souches de sous-type CRF02\_AG évolueraient sous la pression de sélection des ARV. Nous avons abordé ces questions dans une étude de cohorte de 132 sujets infectés majoritairement avec le sous-type CRF02\_AG débutant une thérapie de première ligne. Nos

résultats suggèrent que la présence de mutation de résistance primaire pourrait avoir un effet sur l'efficacité du traitement. Par exemple, la présence d'une seule mutation INNTI avant traitement comme K103N ou V179E était suffisante pour mener à l'échec au traitement (charge virale supérieure à 400 copies/ml). Par ailleurs, nous avons effectué des expériences in vitro pour mieux évaluer l'impact du polymorphisme L10I/V chez le sous-type CRF02\_AG. Il faut savoir que le rôle de ce polymorphisme reste incertain chez le sous-type CRF02\_AG, car aucune étude in vitro n'avait été réalisée auparavant.

Nos résultats indiquent chez le sous-type sauvage CRF02\_AGwt\_10L une légère augmentation de la concentration inhibitrice 50% (IC50) pour le darunavir, le lopinavir et le nelfinavir comparativement au sous-type de référence B HXB2\_10L avec respectivement un « Fold Change » (FC) de 1,2, 1,3 et 1,5. Cette augmentation est plus importante pour le lopinavir avec un FC (1,3) très proche de son seuil biologique (1,6). Comparativement au type sauvage CRF02\_AGwt\_10L, nos deux mutants CRF02\_AGL10I et CRF02\_AGL10V ont démontré une légère augmentation d'IC50 pour l'indinavir (avec respectivement un FC de 1,3 et 1,2) et une diminution pour le lopinavir (avec respectivement un FC de 0,78 et 0,75). Toutes ces observations suggèrent que la mutation en position 10 pourrait avoir un impact chez le sous-type CRF02\_AG. Toutefois, la signification clinique de ces observations doit être déterminée.

En conclusion, nos résultats supportent d'une part la nécessité de renforcer la surveillance de la résistance aux ARV et d'autre part, il fournit des informations nécessaires à l'amélioration des stratégies thérapeutiques afin de prévenir les échecs aux traitements chez les sous-types non B, particulièrement le CRF02\_AG.

#### **Mot-clés**

Sous types non-B du VIH-1, traitement antirétroviral, mutations de résistance, L10I/V dans la résistance aux IP in vitro chez CRF02\_AG.

## Summary

We conducted this study to assess the impact of an increased use of antiretroviral (ARV) treatment on the emergence of resistance in a cohort of subjects infected with HIV-1 enrolled in Mali to receive antiretroviral therapy.

The first part of this work evaluated the incidence of primary resistance with 101 ARV treatment naive subjects. We demonstrated that the majority of subjects (71.3%) were infected with subtype CRF02\_AG. The prevalence of primary resistance was 9.9%. This rate exceeds the average of 5.5% observed in developing countries and the 5% threshold set by the WHO as part of the HIV drug resistance surveillance. The thymidine-associated mutations (TAMs) M41L, D67N, L210W, T215A/Y, K219E, which are associated with resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), and K103N, V108I, Y181C and V179E, which are involved in resistance to non nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), were predominantly observed. These mutations are compatible with the first line regimens used in Mali, including stavudine, lamivudine, and nevirapine. We did not find major mutations associated with resistance to protease inhibitors (PI) probably because this class of drugs is rarely used in Mali. However, several polymorphisms in the protease gene such as L10I and L10V were observed at a very high frequency (18.80%).

Given these initial results, a logical extension of this work was to evaluate how these strains evolve under the selective pressure of ARV treatment. We have addressed these issues in a cohort study of 132 subjects predominantly infected with the subtype CRF02\_AG that started a first-line therapy. Our results suggest that the presence of primary resistance mutation could affect treatment efficacy. For example, the presence of a single NNRTI mutation K103N or V179E before treatment initiation was sufficient to lead to treatment failure (viral load > 400

copies/ml). Otherwise, the role of L10I/V polymorphism remains uncertain in the CRF02\_AG subtype. Therefore, we performed in vitro experiments to assess the impact of this polymorphism in subtype CRF02\_AG on resistance to PI.

Our results indicate in wild type CRF02\_AGwt\_10L a slight increase of the half maximal inhibitory concentration (IC50) for darunavir, lopinavir and nelfinavir compared with subtype B reference HXB2\_10L with a Fold Change (FC) 1.2, 1.3 and 1.5, respectively. This increase was the greatest for lopinavir with a FC (1.3) very close to his biological threshold (1.6). Compared to wild type CRF02\_AGwt\_10L, the two mutants CRF02\_AGL10I and CRF02\_AGL10V showed a slight increase of IC50 for indinavir (FC of 1.3 and 1.2, respectively) and lower for lopinavir (FC of 0.78 and 0.75, respectively). All these findings suggest that the mutation at position 10 may have an impact on resistance to PI in subtype CRF02\_AG. However, the clinical significance of these observations remains to be determined.

In conclusion, our results support the need for strengthening HIV drug resistance surveillance and provide information toward the improvement of therapeutic strategies to prevent treatment failure in non-B subtype, particularly the subtype CRF02\_AG.

### **Key words**

HIV-1 subtypes non B, antiretroviral treatment, mutations, primary resistance, Drug Resistance,  
L10I/V impact in CRF02\_AG

## Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 Histoire du VIH.....	3
1.2 Épidémiologie.....	5
1.3 Virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	8
1.3.1 Organisation du VIH.....	9
1.3.2 Cycle de réplication.....	15
1.3.2.1 L'entrée du Virus dans les cellules.....	17
1.3.2.1.1 Liaison gp120 avec le récepteur CD4.....	17
1.3.2.1.2 Fixation de gp120 aux corécepteurs.....	21
1.3.2.1.3 Fusion membranaire et entrée du virus.....	23
1.3.2.2 Transcription inverse, décapsidation et intégration.....	26
1.3.2.3 Traduction et assemblage.....	28
1.3.3 Diversité du VIH : Causes et conséquences.....	31
1.3.3.1 Diversité du VIH.....	32
1.3.3.2 Causes de la diversité.....	38
1.3.3.2.1 Erreur de la transcriptase et l'activité de l'APOBEC3.....	38
1.3.3.2.2 Recombinaison.....	39
1.3.3.2.2.1 Mécanismes de recombinaison.....	42
1.3.3.2.3 Contribution de la capacité répllicative.....	46
1.3.3.3 Conséquences de la diversité.....	47
1.3.3.3.1 Pouvoir pathogène.....	47



1.3.3.3.2 Diagnostic.....	48
1.3.3.3.3 Vaccination.....	51
1.4 Histoire naturelle de la maladie SIDA.....	53
1.4.1 Primo-infection.....	53
1.4.2 Phase d'infection chronique.....	58
1.4.3 Phase symptomatique et le Sida.....	59
1.5 Traitement antirétroviral et résistance.....	60
1.5.1 Les antirétroviraux.....	61
1.5.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse.....	61
1.5.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse.....	63
1.5.1.3 Les inhibiteurs de protéase.....	64
1.5.1.4 Les inhibiteurs d'Intégrase.....	65
1.5.1.5 Les inhibiteurs de CCR5.....	65
1.5.1.6 Les inhibiteurs de fusion.....	66
1.5.1.7 Les inhibiteurs de maturation.....	66
1.5.2 Résistance aux traitements.....	67
1.5.2.1 Mutations de résistance.....	67
1.5.2.2 Résistance aux différentes classes d'ARV.....	69

1.5.2.2.1	Résistance aux INTIs.....	69
1.5.2.2.2	Résistance aux INNTIs.....	74
1.5.2.2.3	Les mutations au domaine de connexion RT-RNase-H.....	77
1.5.2.2.4	Résistance aux IP.....	79
1.5.2.2.5	Résistance aux Inhibiteurs d'intégrase.....	86
1.5.2.2.6	Résistance aux Inhibiteurs de corécepteur CCR5.....	88
1.5.2.2.7	Résistance aux inhibiteurs de fusion (T20).....	92
1.5.2.3	Types de résistance.....	93
1.5.2.3.1	Resistance naturelle.....	94
1.5.2.3.2	Résistance primaire.....	94
1.5.2.3.3	Résistance secondaire.....	98
1.5.2.4	Méthode d'évaluation de la résistance.....	99
1.5.2.4.1	Test phénotypique.....	99
1.5.2.4.2	Test génotypique.....	100
1.5.2.4.3	Interprétation des tests de résistance.....	105
1.5.2.5	Diversité et résistance.....	107
1.6 VIII	Hypothèses de recherche et objectifs.....	113
1.6.1 VIII.1	Hypothèses de recherche.....	113
1.6.2	Objectifs de recherche.....	114

2. Résultat.....	115
2.1 Article 1: Haut niveau de résistance primaire au Mali.....	116
2.2 Article 2: Voies de résistance aux antirétroviraux et impact de la mutation L10I/V au niveau de la protéase chez le sous type non B.....	139
3. Discussions générales.....	168
4. Conclusion.....	182
5. Bibliographie.....	184

## Liste des figures

Figure.1 : Stèle égyptienne, sujet avec une béquille, probablement atteint de poliomyélite.....	4
Figure.2 : Structure du VIH, du génome viral et des gènes de régulation.....	15
Figure.3 : Schéma représentatif du cycle de réplication du VIH.....	16
Figure.4 : Interaction gp120-CD4.....	20
Figure 5. Structure de CCR5 avec les domaines transmembranaire (TM1-7).....	22
Figure 6. Entrée du VIH.....	25
Figure.7 : schéma représentatif des étapes de la transcription inverse.....	27
Figure 8. Processus d'intégration.....	29
Figure.9 : Schémat représentatif de l'Assemblage du VIH.....	31
Figure.10 : diversité génétique, VIH-1, VIH-2, SIV et la chaîne de transmission inter espèce....	34
Figure.11 : Structure mosaïque et prévalence du VIH-1 et des formes recombinantes les plus répandues dans le monde.....	35
Figure.12 : Distribution géographique de VIH-1 et formes recombinantes dans le monde.....	37
Figure.13 : Mise à jour 2011 de l'évolution dans le temps de la fréquence des sous types dans la pandémie VIH-1.....	37
Figure.14 : Conditions requises pour la recombinaison.....	43
Figure.15 : Mécanisme de recombinaison par transfert de brin .....	45
Figure.16 : Mécanisme de recombinaison par invasion avec un « <i>megaprimer</i> » .....	45
Figure.17 : Stades d'infection par le VIH et évolution de la virémie et des T-CD4.....	57

Figure.18: Mutations de résistance aux INTI selon « <i>international AIDS society</i> » 2010.....	71
Figure.19 : Mécanisme d'excision des INTI.....	73
Figure.20: Mutations de résistance aux INNTI selon « <i>international AIDS society</i> »2010.....	77
Figure.21 : Structure de deux conformations de la protéase.....	84
Figure.22 : Mutations de résistance aux IP selon « <i>international AIDS society</i> » 2010.....	85
Figure.23 : Différentes conformations du raltégravir et les résidus impliqués dans son interaction avec l'intégrase.....	86
Figure.24 : Mutations de résistance aux IIN selon « <i>international AIDS society</i> » 2010.....	88
Figure.25 : Mécanisme de résistance aux corécepteurs CCR5.....	90
Figure.26 : Mécanisme de résistance aux corécepteurs CCR5 avec utilisation de CCR5 des malgré la présence de l'inhibiteur.....	91
Figure.27 : Mutations de résistance a l'enfuvirtide selon « <i>international AIDS society</i> » 2010.....	93
Figure.28 : Pyroséquençage et la technique de séquençage Roche/454.....	104

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Les classes d'antirétroviraux et leurs molécules.....	62
Tableau 2 : Prévalence de la résistance primaire dans quelques d'Afrique subsaharienne.....	97

## Liste des abréviations

Aa :	Acides Aminés
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
AIP1:	ALG-2 interact proteine
APOBEC3G:	Apolipoprotein B mRNA-editing, Enzyme-Catalytic, polypeptide-like 3G
ARV:	AIDS-associated retroviruses (ancienne appellation du virus VIH ou HIV)
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNg:	ARN génomique
ARNm:	ARN messenger
ARN:	ARN ribosomal
ARV:	Antirétrovirale
CDC:	Center for Diseases Control
CRP:	C - reactive protein
CRF:	Circulating Recombinates Forms
CTL:	Lymphocytes T Cytotoxiques
DC-SIGN:	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin
DIS:	Dimeriation Initiation Site
GALT:	Gut Associated Lymphoid Tissue
Gp120:	Glycoprotéines d'enveloppe
Gp41:	Sous-unité de gp120
GRID:	Gay Related Immune Deficiency
HLA:	Human Leucocyte Antigen
HTLV-1 et 2:	Human T cell Leukemia Virus
IL:	Interleukine
IN:	Intégrase
INTI:	Inhibiteur de la transcriptase inverse,
INNTI:	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP:	Inhibiteurs de la Protéase.
LAV:	Lymphadenopathy Associated Virus
LEDGF/75:	Lens-Epithelium-Derived Growth Factor/p75

LPS:	Lipopolysaccharides
LT:	Lymphocytes T
LTR:	Long Terminal Repeats
MAdCAM1:	Mucosal Addressin Cell Adhesion Associated Molecule 1
MDC:	Mutations au Domaine de Connexion
MC:	Mémoire Central
ME:	Mémoire Effecteur
NCp6/7, 15:	Protéines de Nucléocapside
Nef:	Facteur de Régulation Négatif
NF-kB:	Nuclear Factor kappa B
NFAT:	Nuclear Factor of T-cells
NK:	Natural Killer
ONUSIDA:	Organisation des Nations Unies de lutte contre le SIDA
P17 MA:	Protéine de Matrice de poids moléculaire 17 Da
P24 CA:	Protéines de capsid de poids moléculaire 24 Da
PAMPs:	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS:	Primer Binding Site
PL:	Progresseurs Lents
p-TEFb:	Positive Elongation Factor b
PR:	Protéase
PPT:	Polypurine Tract
PTB:	Polypyrimidine Tract Binding
Rev:	Régulateur de l'Expression des protéines Virales
RNase H:	Ribonucléase H
RTC:	Retrotranscription Complex
RT-PCR :	Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction
SIDA:	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIV:	Simien Immunodéficience Virus
SLPI:	Secretory Leucocyte Protease Inhibitor
SUgp120:	Glycoprotéines d'Enveloppe de Surface
Tat:	Trans-Activateur de la Transcription



TCR:	T cell Receptor
TI:	Transcriptase Inverse
TMgp41:	Glycoprotéines d'enveloppe Transmembranaire
TSG101:	Tumor Susceptibility Gene 101
UDI:	Utilisateurs de Droque Injectable
URF:	Unique Recombinate Form
Vif:	Facteur d'Infectivité Virale
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humain
Vpr:	Protéine Virale r
Vpu:	Protéine Virale u

## Liste des antirétroviraux

### **Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)**

Zidovudine (AZT)

Zalcitabine (ddC)

Stavudine (d4T)

Didanosine (ddI)

Abacavir (ABC)

Lamivudine (3TC)

Emtricitabine (FTC)

Disoproxil fumarate ou ténofovir (TDF)

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

Efavirenz (EFV)

Etravirine (TMC-125)

Névirapine (NVP)

Delavirdine (DLV)

Rilpivirine (TMC-278)

### **Inhibiteurs de la protéase (IP)**

Ritonavir (RTV)

Indinavir (IDV)

Nelfinavir (NFV)

Lopinavir (LPV)

Amprenavir (APV)

Fosamprenavir (FPV)

Atazanavir (ATZ)

Tipranavir (TPV)

Darunavir (DRV)

Saquinavir (SQV)

**Inhibiteurs d'Intégrase**

Raltégravir (RAL)

Elvitégravir (EVG)

GSK 1349572

**Inhibiteurs de CCR5**

Maraviroc

Vicriviroc

**Inhibiteur de fusion**

Enfuvirtide

**Inhibiteur de maturation**

Bivirimat

**Liste des acides aminés**

<b>A</b>	Ala	Alanine
<b>C</b>	Cys	Cystéine
<b>D</b>	Asp	Acide aspartique
<b>E</b>	Glu	Acide glutamique
<b>F</b>	Phe	Phénylalanine
<b>G</b>	Gly	Glycine
<b>H</b>	His	Histidine
<b>I</b>	Ile	Isoleucine
<b>K</b>	Lys	Lysine
<b>L</b>	Leu	Leucine
<b>M</b>	Met	Méthionine
<b>N</b>	Asn	Asparagine
<b>P</b>	Pro	Proline
<b>Q</b>	Gln	Glutamine
<b>R</b>	Arg	Arginine
<b>S</b>	Ser	Sérine
<b>T</b>	Thr	Thréonine
<b>V</b>	Val	Valine
<b>W</b>	Trp	Tryptophane
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosine

**À feus ma mère et mon père  
Sans vous, ce travail ne se serait pas réalisé.**

## Remerciements

Je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude à ma directrice de recherche Pr Cécile Tremblay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Votre exigence pour le travail bien fait, vos qualités scientifiques et humaines et votre disponibilité ont contribué à la réalisation de ce travail. Au terme de ce travail, je garde un souvenir d'un professeur assidu. Recevez ici chère Professeure, toute ma reconnaissance.

Je voudrais également remercier Dr Vinh-Kim Nguyen pour ses conseils précieux, ses qualités scientifiques et sa disponibilité. Merci aussi à tous les collaborateurs du projet ATARAO (Appui au traitement anti rétroviral en Afrique de l'ouest) au Mali.

Je remercie tous les membres de mon laboratoire : Annie Chamberland et Mohamed Sylla pour avoir contribué à ce travail, Odalis Asin Milan pour ses encouragements de tous les jours et Yi Wei.

Merci à l'Université de Montréal de m'avoir accordé une bourse d'exemption et une bourse de fin d'études.

Merci à ma fiancée Ramatoulaye Bomboté et à toute ma famille, mes amis, particulièrement Issa, Seydou Keita et Souleymane Ag Aboubacrine. Merci aussi à tout mon groupe de jeunesse de la ville merveilleuse de Ségou.

Enfin, grand merci aux membres du jury. Vous me faites honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos agendas chargés. Merci pour le temps accordé à ce travail.





# **1. Introduction**

Les maladies virales sont connues depuis des millénaires. Les Babyloniens avaient la connaissance que la rage se transmettait par morsure du chien enragé. Dans la civilisation égyptienne, une stèle montre un sujet boitant avec une béquille (figure 1), probablement touché par la poliomyélite. Par ailleurs, l'inconnu était l'agent impliqué. La conception, en 1884, lors d'une épidémie de fièvre typhoïde à Paris de la bougie de Chamberland (filtre Chamberland) par Charles Chamberland<sup>1</sup> fut un tournant majeur dans la naissance de la virologie. Cette bougie permet de retenir les bactéries et laisse passer les virus dans le filtrat. Ainsi, la première expérience indiquant l'implication d'un agent ultra filtrable, plus petit que les bactéries, fut la transmission de la mosaïque du tabac par D. Ivanowsky en 1892<sup>2</sup>. En 1901, le premier virus humain, l'agent de la fièvre jaune, est identifié par W.Reed, J. Carroll et J. Lazear<sup>3</sup>. La conception en 1939 du microscope électronique, l'invention en 1949 de la culture cellulaire, le séquençage en 1970 par Gilbert et Sanger et la polymérase en chaîne (PCR) en 1985 par Kary Mullis ont beaucoup contribué à l'isolement et la caractérisation de nouveaux virus chez l'homme. Parmi lesquels, nous pouvons noter le fameux virus du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été découvert en 1983 par Pr Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi de l'Institut Pasteur de Paris. Ces deux chercheurs furent récompensés par un prix Nobel en 2008. Depuis sa découverte, le VIH est vite devenu une pandémie et continue aujourd'hui sa course mortelle, avec 25 millions de morts et 60 millions de personnes infectées<sup>4</sup>. L'Afrique subsaharienne paye le plus lourd tribut dans cette pandémie.

Le VIH est considéré comme un virus possédant une grande variabilité génétique. L'accès aux multiples échantillons de VIH et la disponibilité de nouveaux outils moléculaires ont permis la classification du VIH en plusieurs groupes et sous-types.

Depuis plus de 20 ans, des recherches intenses ont permis de mieux comprendre l'organisation de ces virus et les stratégies qu'ils utilisent pour se multiplier et persister dans l'organisme. C'est de cette meilleure compréhension que résultent les importants progrès réalisés ces dernières années en thérapie antirétrovirale (ARV), avec l'apparition de nouvelles molécules contre les souches devenues résistantes. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées contre le VIH. Aujourd'hui, trois classes sont fréquemment utilisées en combinaison pour le traitement des patients: les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et les inhibiteurs de la protéase (IP). Faute de vaccin à ce jour, le traitement constitue le seul espoir pour les personnes vivant avec le VIH. Par contre, celui-ci est menacé par le phénomène d'émergence de virus résistants.

### **1.1 Histoire du VIH**

Vers le début des années 1980, le « *Center for Diseases Control* » ou CDC d'Atlanta annonce la recrudescence d'une pneumonie causée par *Pneumocystis carinii* et du sarcome de Kaposi chez des jeunes homosexuels masculins précédemment en bonne santé alors que ces deux maladies sont normalement observées chez les immunodéprimés. Les premières villes touchées par cette recrudescence étaient Los Angeles, San Francisco et New York. Sachant peu de choses sur cette maladie, l'appellation de « *Gay Related Immune Deficiency* » (GRID), en français le « syndrome gay » apparaît la première. Quelques mois après, d'autres groupes, notamment les utilisateurs de

drogue injectable (UDI) et les transfusés sont touchés. Ceci soulève la possibilité d'une maladie d'origine infectieuse.



**Figure 1.** Stèle égyptienne, sujet avec une béquille, probablement atteint de poliomyélite.  
<http://l-imageetlemot.hautetfort.com/archive/2007/05/20/autant-en-emporte-le-vent.html>

Fin 1981, les modes de transmission sexuelle et sanguine<sup>5</sup> furent établis et l'origine virale est privilégiée eu égard à l'observation de la maladie cette fois chez les hémophiles transfusés<sup>6</sup>. En 1982, les chercheurs se mobilisent contre la maladie qui avait franchi les frontières américaines et l'appellation AIDS (SIDA en français) fut employée pour la première fois. Le 20 mai 1983, deux ans après la première description clinique du SIDA, son agent étiologique, un rétrovirus humain alors inconnu, était identifié à Paris dans le cadre d'une collaboration entre équipes

hospitalières et chercheurs de l'institut Pasteur. L'article de Françoise Barré Sinoussi et Luc Montagnier de l'Institut Pasteur, publié dans la revue « *Science* », décrit pour la première fois le virus responsable de la maladie qui fut nommé « *Lymphadenopathy Associated Virus* » (LAV)<sup>7</sup>. Le 4 mai 1984, l'équipe de Robert Gallo publie un article dans la même revue décrivant l'isolement d'un virus nommé HTLV-3 et aussi supposé responsable de la maladie du SIDA<sup>8</sup>. Le 24 août 1984, l'équipe de Jay A. Levy de San Francisco publia également la découverte de plusieurs rétrovirus qu'elle nomme « *AIDS-associated retroviruses* » ou ARV<sup>9</sup>. En janvier 1985, le séquençage complet du virus LAV est publié dans « *Cell* »<sup>10</sup>. La même année, il a été confirmé que les 3 appellations correspondaient au même virus. En 1986, un nouveau type de LAV fut isolé d'un patient venant d'Afrique de l'Ouest par l'équipe de Luc Montagnier et fut nommé LAV-2<sup>11</sup> par opposition au premier virus LAV qui fut nommé LAV-1. Enfin, en 1986, le LAV fut officiellement nommé Virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ainsi, le LAV-1 devient VIH-1 et le LAV-2 VIH-2.

## 1.2 Épidémiologie

Depuis sa découverte, le VIH a fait 25 millions de morts et 60 millions de personnes infectées selon le rapport ONUSIDA 2009<sup>4</sup>. Dans le rapport ONUSIDA 2010<sup>12</sup>, l'épidémie semble atteindre son apogée en 1996 avec 3.5 millions de nouvelles personnes infectées contre 2,6 millions/année en 2010. Selon le même rapport, les décès liés au SIDA semblent atteindre leur plus haut niveau en 2004 avec un chiffre de 2,2 millions contre 1,8 million/année en 2010. Ainsi, les nouvelles infections ont accusé une diminution de 19% entre 1999-2009 et jusqu'à 25% dans 33 pays entre 2001-2009. Quant à la mortalité, elle a subi une réduction de 19% entre 2004-2009. Ces constats seraient le fruit de la combinaison des efforts de préventions, et de l'effet

bénéfique du traitement antirétroviral largement disponible dans les régions les plus touchées par le VIH. Un autre facteur peut être la méthode d'élaboration des statistiques de décès reliés au SIDA dans certains pays en développement.

L'utilisation des ARV a incontestablement réduit la mortalité des patients vivant avec le VIH. Par contre, le chemin est encore très long, car dans les pays en développement seulement 39% des 14,2 millions de personnes qui ont besoin d'un traitement y ont accédé en 2009<sup>13</sup>. Ce besoin de traitement est défini sur la base du nombre de CD4 ( $<350/\text{mm}^3$ ) et la présence des symptômes liés au SIDA. Ainsi, le traitement est fortement recommandé chez tout patient avec un nombre de CD4  $<350/\text{mm}^3$  et les patients symptomatiques ainsi que les femmes enceintes afin de prévenir la transmission mère-enfant. Par ailleurs, l'instauration du traitement basée sur le nombre de CD4  $<350/\text{mm}^3$  pourrait évoluer rapidement, car plusieurs études montrent aujourd'hui les bénéfices d'un traitement avec un nombre de CD4 plus élevés (350-500/ $\text{mm}^3$ )<sup>14</sup> et même  $>500/\text{mm}^3$ . L'étude multicentrique HPTN052 auprès de 1763 couples sérodiscordants hétérosexuels évaluant l'efficacité de l'instauration rapide du traitement chez les partenaires infectés (es) a montré que le risque de transmission du VIH au partenaire séronégatif est fortement diminué par le traitement. Dans cette étude, deux bras sont comparés, l'un recevant immédiatement le traitement avec un nombre de CD4 entre 350-550 et l'autre tardivement lorsque le nombre de CD4 chute en bas de  $250/\text{mm}^3$ . Les résultats préliminaires montrent 27 cas de transmission du VIH chez le groupe recevant tardivement le traitement contre un seul cas chez le groupe traité immédiatement soit une réduction de la transmission de 96%<sup>15</sup>. Par ailleurs, l'étude de Lewden et al a montré que dans la cohorte COHERE (80642 patients infectés par le VIH), la mortalité des patients qui maintiennent un nombre de CD4  $>500$  pendant au moins trois

ans est comparable à celle de la population générale<sup>16</sup>. Une autre étude appelée START qui est présentement en cours regardera dans le même sens afin d'approfondir nos connaissances sur la question. Elle sera effectuée dans 30 pays avec 4000 participants<sup>17</sup>. Ceci dit, l'application de ces données à la réalité est incertaine. Des efforts ont été quand même constatés au niveau de l'accessibilité aux ARVs, car 1,35 millions de personnes de plus ont reçu le traitement en 2011 dans les pays en développement, faisant passer la couverture de 39% à 47%<sup>13</sup>. En dépit des efforts déployés, le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde demeure encore élevé avec 33,3 millions en 2010 soit une prévalence globale de 0,8%. Les prévalences les plus élevées sont encore observées en Afrique subsaharienne notamment dans sa partie australe<sup>12</sup>. La majorité des personnes infectées sont des femmes (15,9 millions) et les enfants de moins de 15 ans (2,5 millions)<sup>12</sup>. Par ailleurs, les programmes de prévention et de traitement semblent porter un coup dur sur l'incidence. Parmi les 33 pays qui ont montré une diminution considérable de l'incidence de plus de 25%, 22 sont en Afrique subsaharienne<sup>12</sup>. Cependant, d'autres pays comme l'Arménie, le Bangladesh, la Géorgie, le Pakistan, le Kirgizstan, les Philippines et le Tadjikistan montrent une incidence en augmentation<sup>12</sup>. Toutefois, l'Afrique subsaharienne demeure la région la plus touchée et compte pour elle seule 22,5/33,3 millions de personnes vivant avec le VIH, 1,8/2,6 million de nouvelles infections et 1,3/1,8 million de personnes décédées en 2009. Sur les 2,5 millions d'enfants infectés par le VIH dans le monde, 2,3 millions se trouvent en Afrique subsaharienne. Ces chiffres montrent combien l'épidémie est un réel fléau dans cette partie du monde.

Malgré les progrès constatés en Afrique subsaharienne, les conséquences du SIDA restent inestimables. Cette maladie porte un coup fatal à l'espérance de vie déjà minée par la pauvreté et

d'autres problèmes de santé comme la tuberculose et le paludisme. Les jeunes adultes moteurs du développement sont les plus à risque et les plus touchés par l'infection VIH. En plus, le SIDA laisse des milliers d'orphelins qui ont eux aussi un risque très élevé de mourir de la maladie à cause de la pauvreté et d'un manque d'éducation. Le commerce du sexe, aggravé par la pauvreté, est un facteur favorisant l'installation durable de ce fléau. Les guerres dans plusieurs régions d'Afrique et les instabilités politiques auront sans doute un impact négatif sur les efforts de lutte contre le SIDA en entravant de plus en plus le développement et la lutte contre la pauvreté prônés par les objectifs du millenium de l'ONU.

### **1.3 Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**

Le VIH est un virus à acide ribonucléique (ARN) enveloppé, monocaténaire et « *diploïde* » appartenant à la famille des retroviridae. Cette famille tire son nom de la présence d'une enzyme appelée reverse transcriptase (RT) ou transcriptase inverse (TI) en français. Grâce à cette enzyme, ces virus seront capables de transcrire leur ARN en acide désoxyribonucléique (ADN) qui s'intègre dans l'ADN de la cellule hôte sous le nom de provirus. Ce cycle de réplication est commun à l'ensemble de la famille des Retroviridae. Ces virus sont composés de 3 grandes sous-familles, dont celles des oncovirus, des lentivirus et des spumavirus. Les espèces importantes impliquées dans les pathologies chez l'homme sont les HTLV-1 et 2 (Human T cell Leukemia Virus) de la sous-famille des oncovirus et le VIH-1 et 2 de celle des lentivirus. Les retroviridae sont les seuls virus à ARN capables de s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte infectée, du fait de leur capacité à changer leur ARN en ADN. Ces virus peuvent être souvent des oncogènes à l'image des oncovirus, capables de transformer les cellules infectées comme la leucémie à lymphocyte T qu'induit le HTLV-1. Les lentivirus sont responsables de pathologies à évolution



lente d'où leur nom de lentivirus (Lentus = lent en latin). Ces lentivirus sont cytopathogènes contrairement aux HTLV. Ils entraînent une destruction des cellules qu'ils infectent comme c'est le cas du VIH qui s'attaque entre autres aux lymphocytes CD4.

Une des particularités du VIH est sa dynamique de réplication virale, caractérisée par un nombre d'environ  $10^{10}$  nouveaux virus produits chaque jour par une personne infectée<sup>18</sup>. Il est aussi caractérisé par une grande variabilité liée à l'absence de mécanisme de correction des erreurs de transcription au niveau de la TI<sup>19</sup>. Cette variabilité confère au virus un grand pouvoir d'adaptation par rapport à son environnement, c'est à dire à son hôte. Ce pouvoir d'adaptation va lui permettre d'échapper en particulier aux réponses immunes ou aux thérapeutiques antirétrovirales par sélection des mutants, capables de résister et de se reproduire. Ceci entraîne une grande variabilité des virus produits.

Depuis presque 20 ans, des recherches intenses ont permis de mieux comprendre l'organisation de ces virus et les stratégies qu'ils utilisent pour se répliquer et persister dans l'organisme.

### **1.3.1 Organisation du VIH**

On distingue deux types de virus VIH: VIH-1 et VIH-2 avec 42% d'homologie au niveau du génome. Leur structure est similaire, les seuls changements sont les poids moléculaires des protéines et les enzymes constitutives. De plus, à la place du Vpu pour le VIH-1 c'est le Vpx au niveau du VIH-2. Une remarque importante est que la TI du VIH-2 a une configuration similaire à celui du VIH-1, mais il existe des différences structurelles au niveau de la poche de liaison des

inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI) de la TI<sup>20</sup>. Ce qui fait que les INNTI ne sont pas actifs sur le VIH2.

En ce qui concerne le VIH-1, il se résume à un ensemble de 15 protéines et de 2 ARNs identiques d'environ 10-Kb<sup>21</sup>. Virus sphérique d'un diamètre moyen de 145 nanomètres, le VIH-1 a une structure comportant de l'extérieur à l'intérieur: une enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique qui dérive de la cellule infectée et de deux glycoprotéines, gp120 et gp 41. La molécule gp 41 traverse la bicouche lipidique tandis que la molécule gp120 occupe une position plus périphérique. Ainsi, gp120 joue le rôle de récepteur viral qui interagit avec la molécule membranaire CD4 présente à la surface des cellules hôtes. L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte, il en résulte qu'elle contient quelques protéines membranaires de cette dernière, y compris des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette enveloppe recouvre une première couche appelée matrice, composée de protéine de matrice (P17 MA). La matrice, à son tour, recouvre une couche plus profonde nommée capsid, composée de protéines de capsid (P24 CA). Le génome, situé plus en profondeur dans la capsid, est associé aux protéines de nucléocapsid (NCp6/7) ainsi qu'aux enzymes comme l'intégrase (p32) et la transcriptase inverse (p64). La protéase quant à elle se situe entre la matrice et la capsid (figure 2A). Ce génome est composé de deux copies d'ARN simple brin fait de 9181 nucléotides avec 2 régions répétées appelées « *long terminal repeats* » (LTR) au niveau des extrémités. LTR est composé de 3 domaines U3, R et U5. Au total, le génome contient 9 cadres de lecture (figure 2B)<sup>22</sup>. Trois codent pour les protéines structurelles Gag, Pol et Env, qui subissent une protéolyse en donnant des protéines individuelles ; les six autres codent pour des protéines régulatrices. Avec ses 10 Kilos bases (kb), l'ARN viral est le composant majeur de la particule infectieuse. La partie

localisée en 5' comporte les domaines R et U5 qui sont nécessaires à l'activation et au contrôle de la transcription, alors que celle en 3' possède les signaux terminateurs de transcription dont le signal de polyadénylation.

La protéine Gag, codée par le gène *gag*, est le précurseur des protéines structurales internes du virus. Ce précurseur provient d'un grand ARN messenger (ARNm) non épissé. Il est clivé par la protéase virale donnant naissance aux protéines de matrice MA p17, de capsid CA p24, de nucléocapsid NCp15, NCp7 et la protéine p6. La protéine MA p17 forme des trimères pour permettant la fixation des glycoprotéines d'enveloppe TMgp41 et SUgp120. La protéine CAp24 s'associe en multimères pour former la capsid. Les nucléoprotéines NCp15 et NCp7 se lient aux ARN du génome viral pour former une structure nucléoprotéique de type pseudo chromatine<sup>23</sup>. Quant à la protéine P6, elle intervient dans le bourgeonnement viral<sup>24</sup>.

Le précurseur prGag-Pol est codé par le gène *pol*. Il provient lui aussi du même grand ARN messenger (ARNm) non épissé comme prGag. Ce précurseur assure la formation des trois protéines enzymatiques du virus: la protéase (PR), la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN). La protéase est une protéine capable de s'auto cliver en « *trans* ». Elle est responsable de la maturation protéolytique des précurseurs prGag et prGag-Pol. La transcriptase inverse assure le passage de l'ARN viral en ADN grâce à son activité rétrotranscriptase. Cette protéine possède également une activité additionnelle ribonucléase H (RNase H) qui permet de digérer les brins d'ARN déjà transcrits. L'intégrase permet l'insertion du génome viral dans l'ADN cellulaire en raison de son activité de recombinaison. En effet, cette enzyme coupe les ADN cellulaire et viral

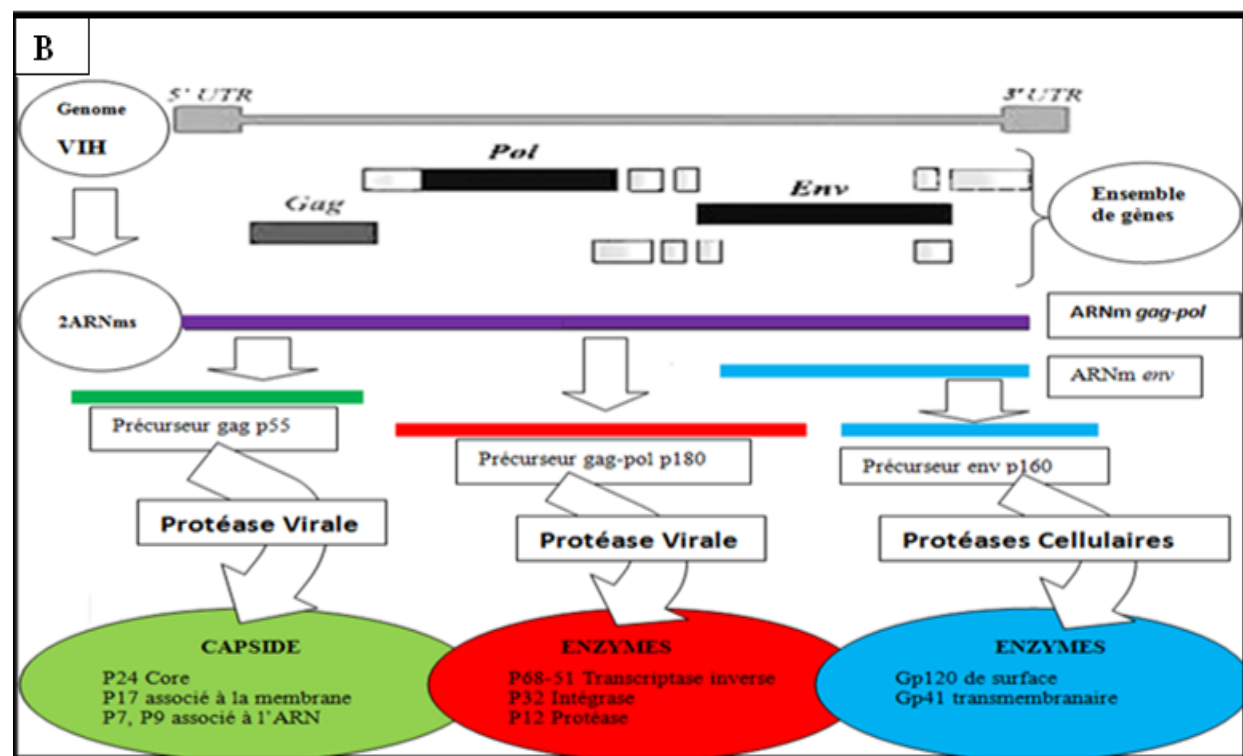
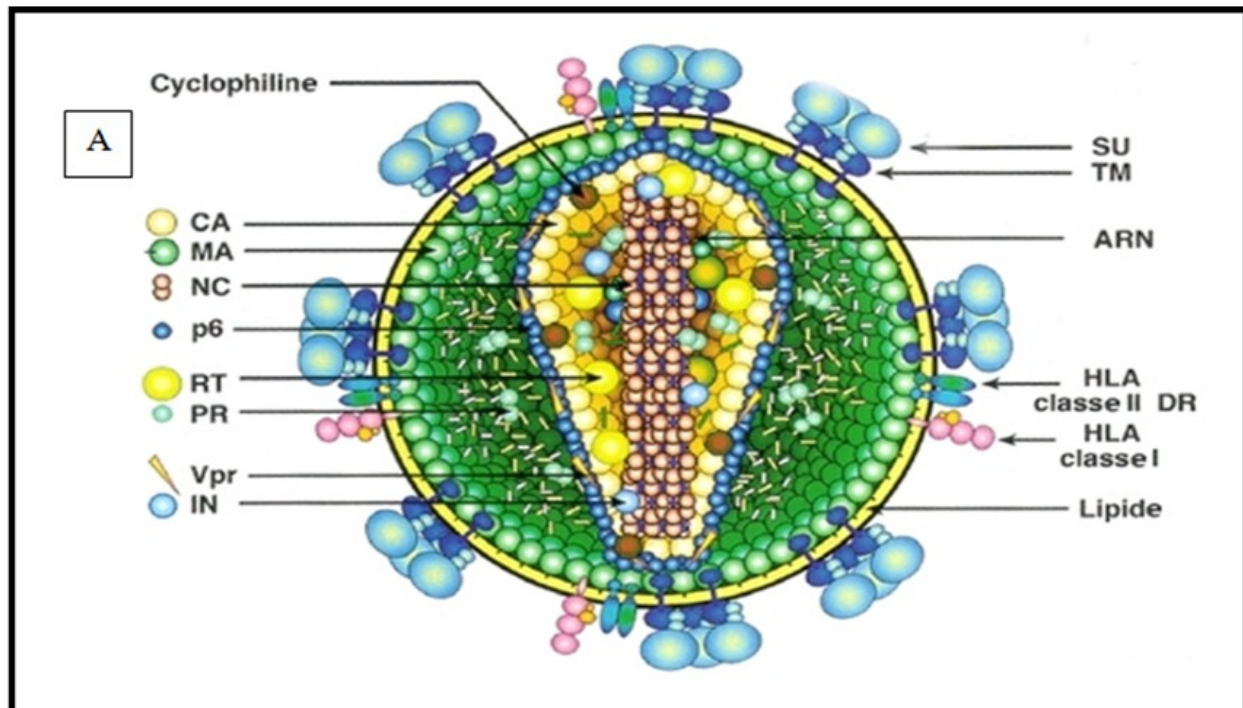
pour en faire des bouts complémentaires. Ensuite, elle insère l'ADN viral dans celui de la cellule hôte et finit par une ligature.

Le gène *env* code pour la protéine gp160. Cette protéine provient d'un petit ARNm peu épissé. Elle est clivée par les protéases cellulaires en deux protéines différentes : la protéine de surface (SU gp120) et la protéine transmembranaire (TM gp41). Ces deux protéines jouent un rôle primordial dans l'entrée du virus. Quant aux protéines de régulation, elles proviennent d'un ensemble de gènes après traduction d'un petit ARNm épissé (figure 2C) <sup>22</sup>. Ces protéines de régulation sont particulièrement importantes dans l'accomplissement de plusieurs processus de réplication comme la transcription, l'import nucléaire de l'ADN proviral et l'export nucléaire des ARNm viraux. Elles sont également impliquées dans le processus d'échappement du système immunitaire.

Les protéines de régulation proviennent des 6 gènes de régulations:

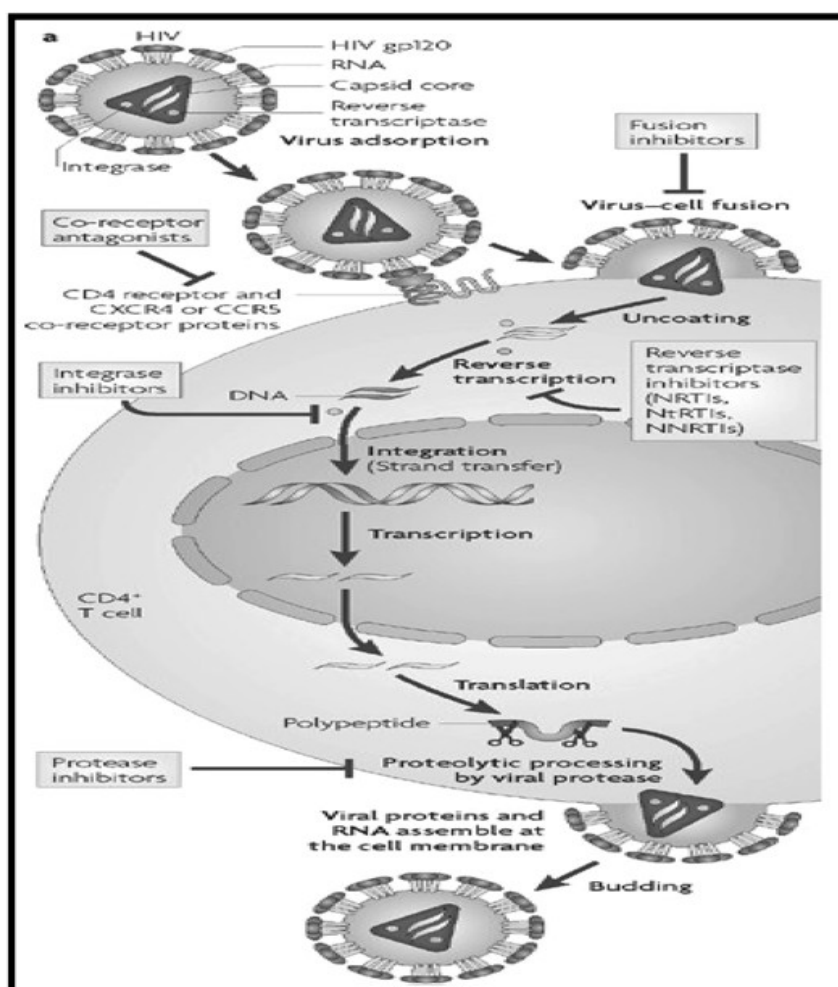
- Le gène *vif* code la protéine Vif (facteur d'infectivité virale) qui permet une meilleure maturation des virions et un nombre réduit de particules virales défectueuses.
- Le gène *vpr* code la protéine Vpr (protéine virale r) qui facilite le transfert du complexe de pré-intégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule hôte. D'autres fonctions ont été également attribuées à cette protéine, parmi lesquelles deux sont plus largement acceptés : le déclenchement de l'arrêt au stade G2 du cycle cellulaire des cellules en division et l'amélioration de l'infection des macrophages en phase terminale de différenciation.

- Le gène *rev* code la protéine Rev (régulation de l'expression des protéines virales) qui est une phosphoprotéine de 19 kDa qui inhibe l'épissage des ARNm viraux et permet leur transport vers le cytoplasme pour la traduction. Ceci favorise l'expression des ARNm peu ou pas épissés et l'expression des protéines de structure et des protéines enzymatiques. La protéine Rev peut faire des navettes entre le noyau et le cytoplasme. À noter qu'elle est codée par 2 séquences éloignées l'une de l'autre (*rev1* et *rev2*).
- Le gène *tat* code la protéine Tat (transactivateur de la transcription). Son rôle est l'activation de la transcription virale en augmentant l'efficacité de l'initiation de la transcription à partir du promoteur LTR.
- Le gène *vpu* donne la protéine Vpu (protéine virale u) présente seulement chez le VIH-1 (pour VIH-2, elle est remplacée par Vpx). Elle facilite la libération des particules virales lors du bourgeonnement et permet aussi la dégradation du CD4 et le transfert de gp160 vers la membrane.
- Le gène *nef* code la protéine Nef (facteur de régulation négatif) qui joue un rôle fondamental dans la propagation du virus et l'évolution de l'infection vers le SIDA. Au niveau des cellules infectées, elle diminue l'expression du récepteur CD4<sup>25</sup> et des molécules du CMH de classe I<sup>26, 27</sup>.





préférentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou les monocytes/macrophages primaires. Un second récepteur ou corécepteur est nécessaire. Il s'agit préférentiellement de CCR5 (récepteur des chimiokines C-C) ou CXCR4 (récepteur aux chimiokines CXC). Les virus qui utilisent CCR5 ou CXCR4 sont appelés virus R5 ou X4 respectivement et ceux qui utilisent les deux sont définis sous le nom de virus R5X4.



**Figure 3.** Représentation du cycle de réplication du VIH. Les cibles du traitement sont aussi représentées. Tiré de Youcef et Erik. J Med Chem 2010<sup>28</sup>. Avec la permission d'American Chemical Society Publisher.



### 1.3.2.1 L'entrée du Virus dans les cellules

Les mécanismes mis en place par le VIH pour entrer dans les cellules cibles font intervenir des processus complexes qui peuvent être divisés en trois grandes étapes. Une première étape consiste en un établissement de contact entre la glycoprotéine gp120 virale et le récepteur CD4. La deuxième étape implique des corécepteurs CXCR4 ou CCR5 cellulaires qui se fixent à la gp120 après changement de conformation de celui-ci. La troisième étape est un rapprochement maximum des deux membranes cellulaire et virale assuré par la glycoprotéine gp41 viral. Ensuite survient la fusion de ces deux membranes.

#### 1.3.2.1.1 Liaison gp120 avec le récepteur CD4

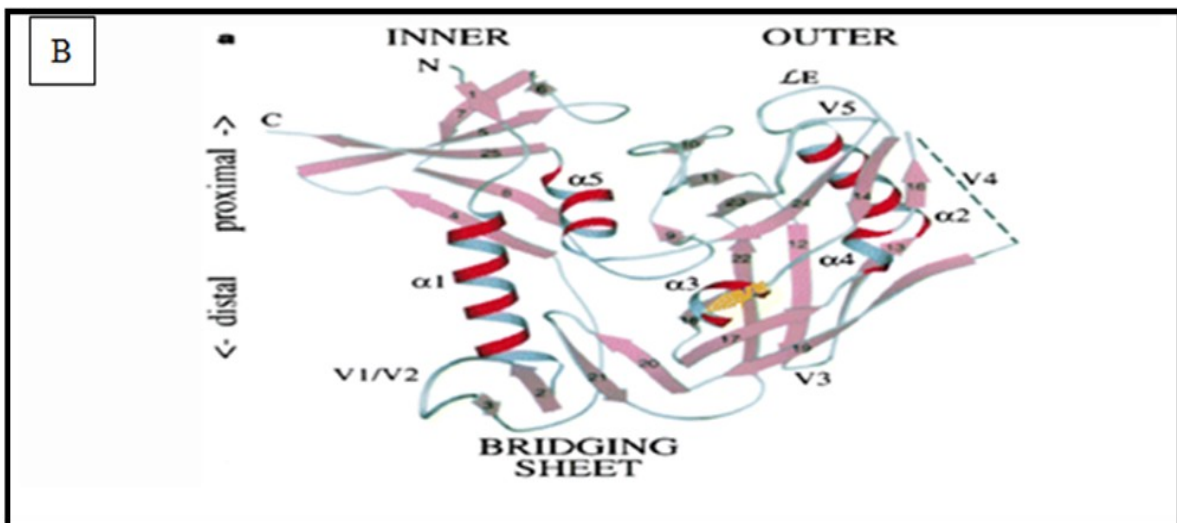
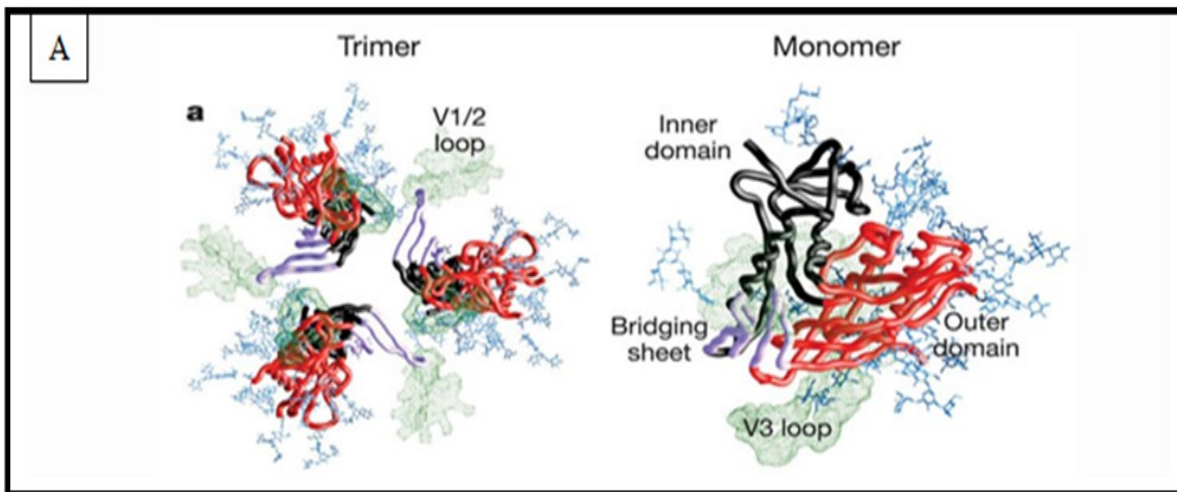
Le premier événement nécessaire au mécanisme d'entrée du VIH dans les cellules cibles est l'établissement d'un contact entre le gp120 viral et le récepteur CD4. Ce dernier fut identifié comme un récepteur essentiel dans l'infection des rétrovirus<sup>29</sup> et particulièrement du VIH en 1984<sup>30</sup>. Le CD4 est une glycoprotéine de la famille des immunoglobulines (Ig). Exprimé sur les lymphocytes T (LT), il joue un rôle majeur dans l'immunité à médiation cellulaire. Le CD4 est un corécepteur qui stabilise la liaison du complexe antigène-CMHII avec le TCR ou « *T cell Receptor* ». Il aide aussi ce dernier à amplifier les signaux d'activation des lymphocytes T. Le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII) est un récepteur situé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui s'associe aux antigènes pour les présenter aux cellules effectrices comme les lymphocytes T. Le TCR est le récepteur des lymphocytes T qui reconnaît le complexe CMHII-Antigène. Cette première interaction induit un signal qui est amplifié par le CD4. En effet, suite à l'interaction du TCR avec le CMHII, le CD4 lui aussi reconnaît ce dernier et se fixe sur son segment bêta 2. Cette liaison du CD4 permet de recruter des enzymes

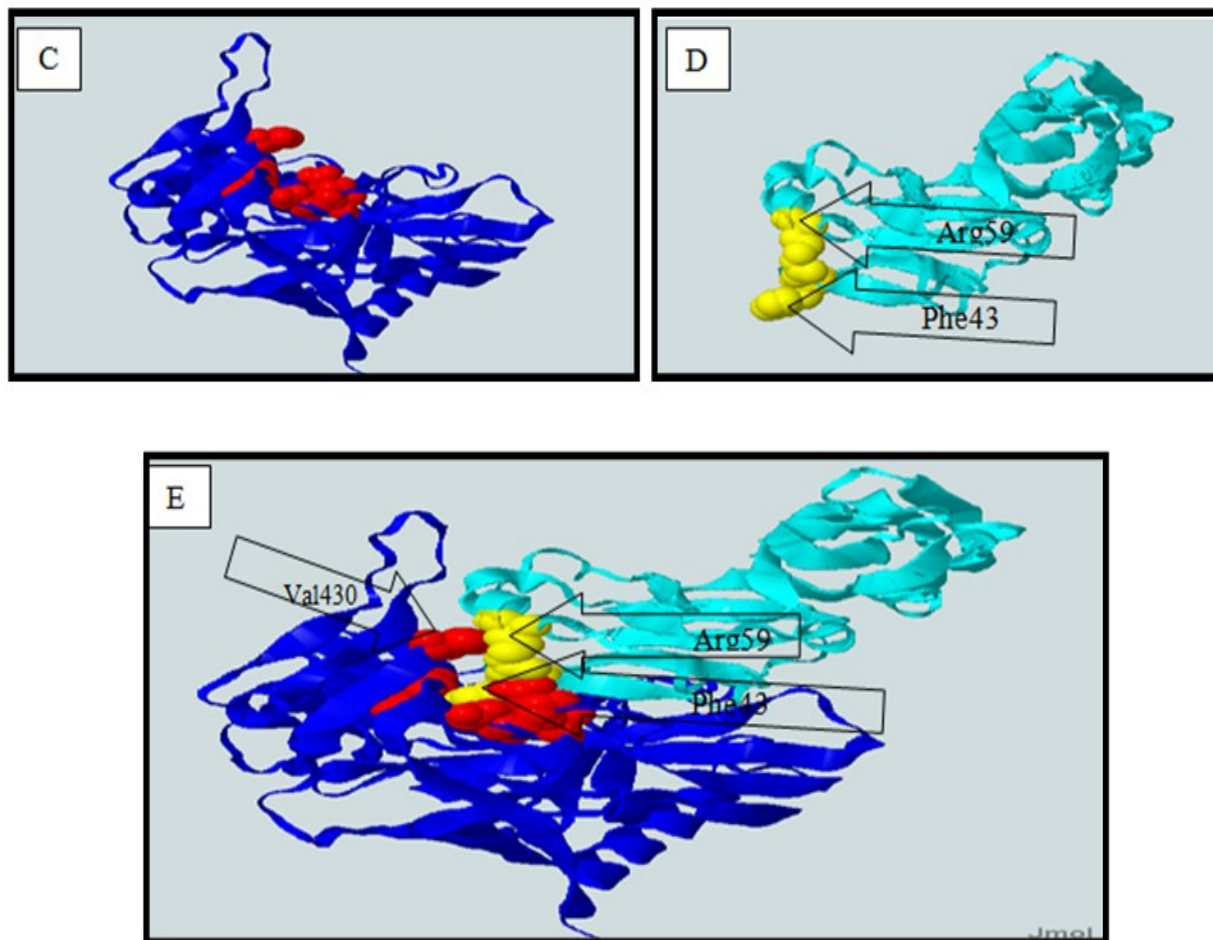
d'activation telle que la tyrosine kinase (Ick) nécessaire à la voie d'activation des lymphocytes TCD4 et amplifie ainsi le signal initié par le TCR. Le CD4 est constitué de trois régions distinctes: une région extracellulaire avec quatre domaines (D1 à D4), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique. La région D1 est constituée elle aussi en trois sous-régions (CDR1, CDR2 et CDR3). La sous-région CDR2 est principalement impliquée dans la liaison de CD4 avec gp120. La phénylalanine en position 43 (Phe43), l'arginine 59 (Arg59) (figure 4D) et les résidus de charges positives de cette sous-région sont essentiels dans la liaison de CD4 avec gp120<sup>31, 32</sup>.

La glycoprotéine gp120 est la partie du virus la plus exposée. Elle est associée sous forme de trimère dont chaque monomère est attaché à une molécule de gp41 de façon non covalente (figure 4A)<sup>32</sup>. La Gp120 est constituée de cinq régions constantes (C1-C5) séparées par cinq régions variables (V1-V5). L'analyse cristallographique de gp120 montre une structure unique constituée d'un domaine interne « inner » et d'un domaine externe « outer » dont leur jonction est assurée par quatre brins bêta antiparallèles appelés « bridging sheet » (figure 4B)<sup>31</sup> qui contient les régions constantes C3 et C4.

La gp120 interagit avec CD4 via les résidus exposés dans trois régions distinctes de sa surface. Ces régions comprennent les hélices alpha et la boucle V1/V2 du domaine interne, la boucle de liaison de CD4 « CD4 binding loop » au niveau du domaine externe et une grande partie du bridging sheet<sup>31, 32</sup>. Les résidus importants sont la glutamine 370 (Glu370), l'isoleucine 371 (Ile371), le tryptophane 427 (Trp427), la glycine 473 (Gly473) et la valine 430 (Val430) (figure 4C). Les quatre premiers interagissent avec la phénylalanine 43 (Phe43) alors que la Val430 se

lie avec l'Arg59 de CD4 (figure 4E). Très récemment, il a été montré que la position D279 de gp120 établit une interaction avec la lysine en position 31 (K31) au niveau de CD4 et renforce l'interaction gp120-CD4<sup>33</sup>. Ainsi, l'interaction gp120-CD4 permet d'établir un premier contact avec la cellule. Par contre, ce contact n'est pas suffisant pour l'entrée, mais assure un changement de conformation au niveau de gp120 et permet la fixation de ce dernier aux corécepteurs<sup>34</sup>.





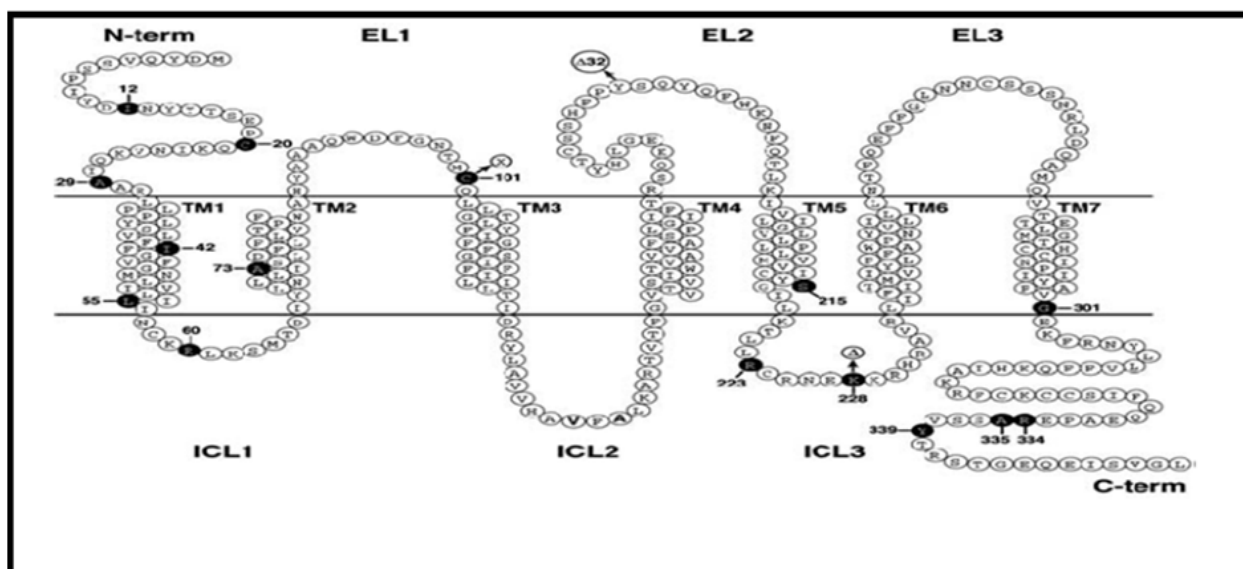
**Figure 4.** Interaction gp120-CD4. A) Mono et trimère gp120. Tiré de Kwong PD et al. Nature 1998<sup>32</sup>. Avec la permission de Nature Publishing Group. B) Monomère gp120 avec les domaines interne « inner domain », domaine externe « extern domain » et le feuillet de liaison ou bridging sheet. Tiré de Kwong PD et al. Nature 2002<sup>31</sup>. Avec la permission de Nature Publishing Group. C) Structure de gp120 avec les acides aminés importants en rouge (Glu370, Ile371, Trp427, et Val430.) D) Structure de CD4 avec les acides aminés importants en jaune (Phe43, Arg59). E) Interaction CD4-gp120 dans laquelle Glu370, Ile371, Trp427 interagissent avec Phe43 et Val430 avec Arg59.<http://webetab.ac-bordeaux.fr/Etablissement/LJay/pedagogie/disciplines/svt/immuno/RHunt/gp120-cd4.fr.htm>

### 1.3.2.1.2 Fixation de gp120 aux corécepteurs

La fixation aux corécepteurs constitue la deuxième étape qui précède la fusion. Malgré son rôle central dans la fusion, le récepteur CD4 n'est pas suffisant pour entraîner la fusion des deux membranes<sup>34</sup>. Les récepteurs CXCR4 et CCR5 ont été identifiés comme corécepteurs du VIH jouant un rôle important dans l'entrée du virus<sup>35, 36</sup>. Préalablement nommé fusine, CXCR4 a été le premier identifié comme corécepteur du VIH. Une étude réalisée par Feng et al en 1996 a montré que le transfert de cDNA de CXCR4 et CD4 dans les cellules non permissives permet la fusion du VIH-1 avec ces cellules et leur infection<sup>37</sup>. Dans la même étude, le rôle de CXCR4 a été confirmé avec l'utilisation d'un anticorps anti-CXCR4 qui a permis de bloquer la fusion du VIH-1 avec des cellules CD4+ humains, empêchant ainsi leur infection. Pour CCR5, d'abord en 1995, Cocchi et al ont observé que les ligands «Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha et beta» (MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ ) et «Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted» (RANTES) de CCR5 entraînaient une inhibition de l'infection des macrophages par le VIH-1<sup>38</sup>. Ensuite, cette observation permettra à plusieurs équipes de chercheurs de découvrir que CCR5 est le corécepteur principal du VIH<sup>39-41</sup>.

CXCR4 et CCR5 sont des corécepteurs appartenant à la famille des récepteurs aux chimiokines. Ces deux récepteurs sont classés dans l'un ou l'autre des deux groupes de chimiokines, les CC avec la présence de deux cystéines dans la structure et les CXC ou les deux cystéines sont séparées par un acide aminé quelconque. Ce sont des récepteurs caractérisés par la présence de sept domaines transmembranaires et couplés aux protéines G. Leur structure présente trois boucles extracellulaires (EL1-EL3) avec une partie N-terminale et trois autres boucles intracellulaires (ICL1-ICL3) avec une partie C-terminale (figure 5)<sup>42</sup>. Ces deux corécepteurs,

CXCR4, dont les ligands naturels sont CXCSDF-1, CXCL12 et CCR5, joue un rôle important dans l'immunité.



**Figure 5.** Structure de CCR5 avec les domaines transmembranaire (TM1-7). EL1-3 (boucle extra cytoplasmique). ICL1-3 (boucle intra cytoplasmique). Tiré de Dong HF et al. Genes Immun 2005<sup>42</sup>. Avec la permission de Nature Publishing Group.

L'interaction gp120-CD4 entraîne des changements structuraux au niveau de gp120, dont le repliement du feuillet de liaison ou (bridging sheet) et font découvrir ainsi les sites de liaisons des corécepteurs<sup>43, 44</sup>. Le feuillet  $\beta$ 20- $\beta$ 21, qui devient une partie du bridging sheet<sup>31</sup> après modification structurale, et les boucles V1/V2/V3 participent à la liaison de gp120 aux corécepteurs<sup>31, 44</sup>. Par ailleurs, le modèle actuel d'interaction de gp120 avec les corécepteurs suggère que la boucle V3 de gp120 interagit principalement avec la région de la deuxième

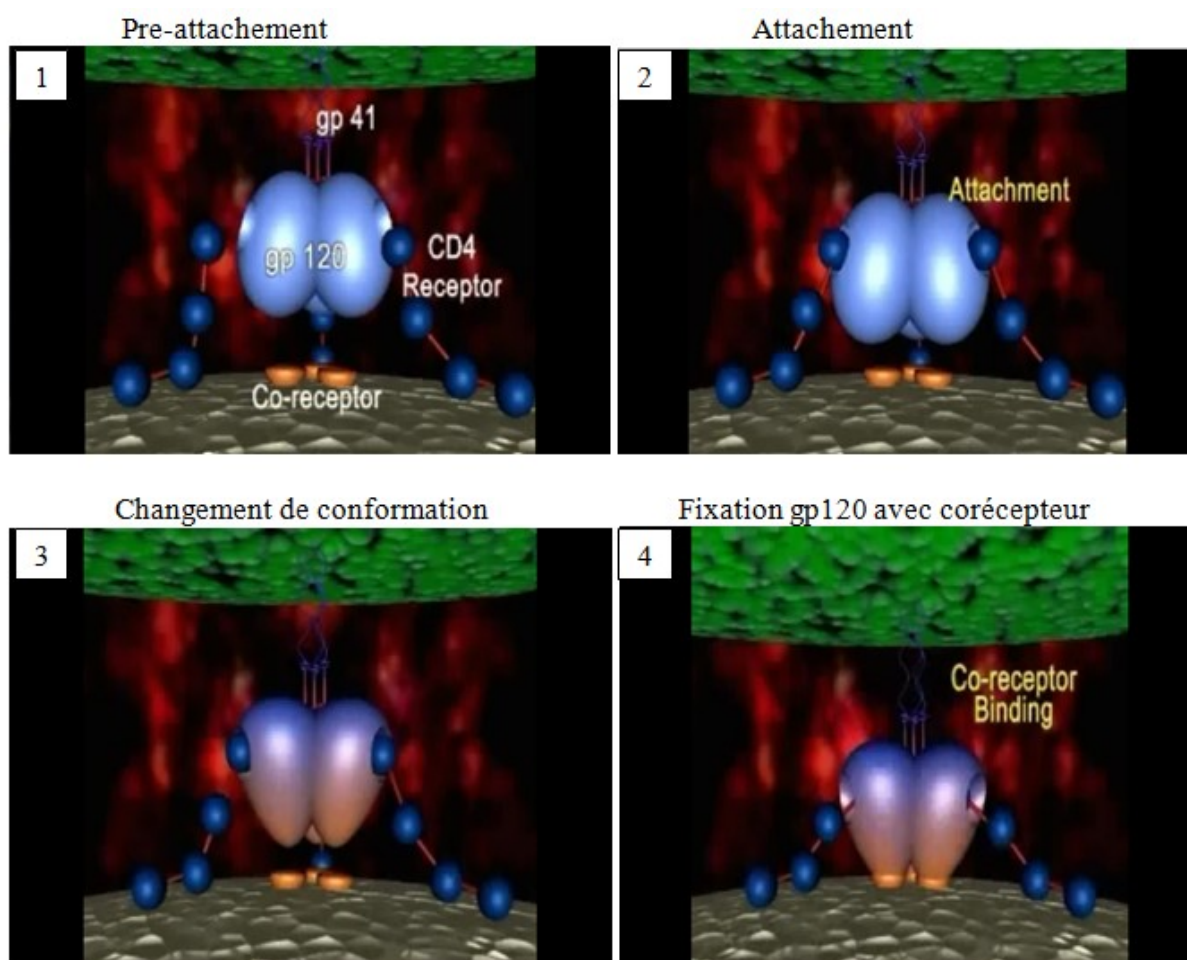
boucle extracellulaire ECL2 du corécepteur, tandis que les feuillets du bridging sheet de gp120 interagissent avec la partie N-terminal du corécepteur<sup>45, 46</sup>. Toutefois, plusieurs études montrent que la boucle V3 serait le principal déterminant du tropisme et conditionne le choix du corécepteur<sup>47, 48</sup>. Par contre, les mécanismes réels impliqués restent à déterminer.

La liaison du complexe CD4-gp120 avec le corécepteur induit un changement de conformation supplémentaire dans gp120, ce qui conduit à un réarrangement structurel dans gp41 et permet l'insertion de ce dernier dans la membrane cellulaire, grâce à son peptide de fusion, aboutissant au rapprochement et la fusion des deux membranes.

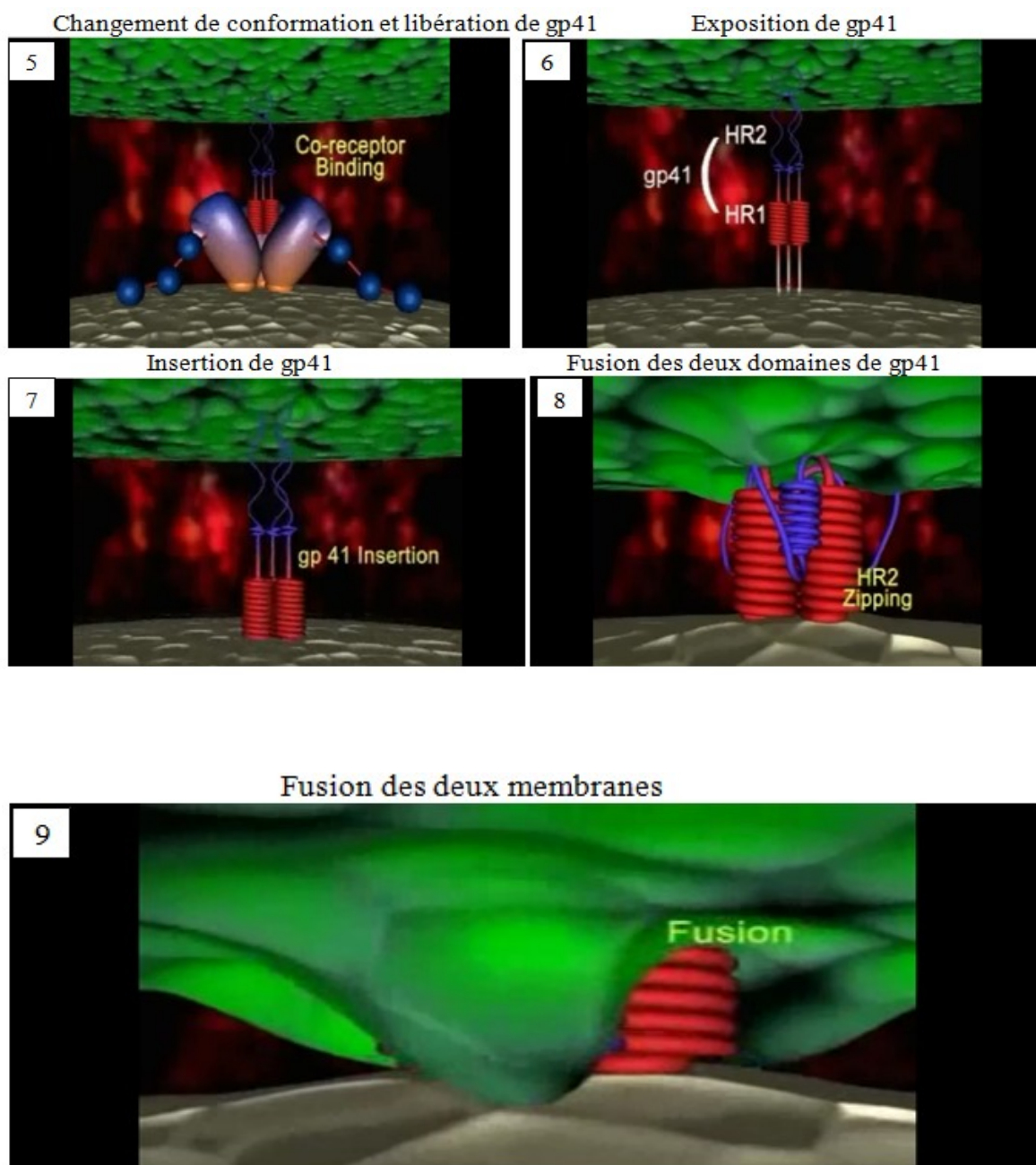
#### **1.3.2.1.3 Fusion membranaire et entrée du virus**

La dernière étape qui précède l'entrée du VIH dans les cellules est la fusion membranaire VIH-cellule assurée par la glycoprotéine gp41. La gp41 est la partie transmembranaire de l'enveloppe du virus. Composée de 340 à 350 acides aminés, elle comporte trois régions distinctes: une première région avec un domaine externe ou ectodomaine, une région transmembranaire et une région cytoplasmique avec la partie C-terminale. L'ectodomaine comporte la partie N-terminale hydrophobe bien conservé avec 15 à 20 acides aminés constituant le peptide de fusion. Le peptide de fusion est suivi par deux structures hélicoïdales, l'un proximal appelé HR1 et l'autre distal appelé HR2. Ces deux structures jouent un rôle important dans la fusion après insertion du peptide de fusion. En effet, la gp41 fonctionne sous forme de trimère: C'est la fixation de gp120 aux corécepteurs et son changement de conformation qui initient cette trimerisation. La partie HR1 est fortement impliquée dans ce processus<sup>49</sup>. Ainsi, après la liaison des corécepteurs, chaque protomère du trimère formé expose son peptide de fusion. Cette première structure de gp41 est appelée structure « pre hairpin ». Elle permet au peptide de fusion de se déployer et de

s'insérer dans la membrane cellulaire. L'insertion du peptide de fusion entraîne un autre changement de conformation et fait appel aux structures hélicoïdales HR1 et HR2. Ces deux structures interagissent en formant une deuxième structure appelée structure en épingle ou « structure hairpin ». La formation de cette structure plus stable permet un rapprochement des deux membranes virales et cellulaire<sup>50</sup>, ce qui entraîne *in fine* la fusion membranaire et la translocation du virus encapsulé dans le cytoplasme cellulaire. L'entrée du virus dans la cellule est résumée par la figure 6.





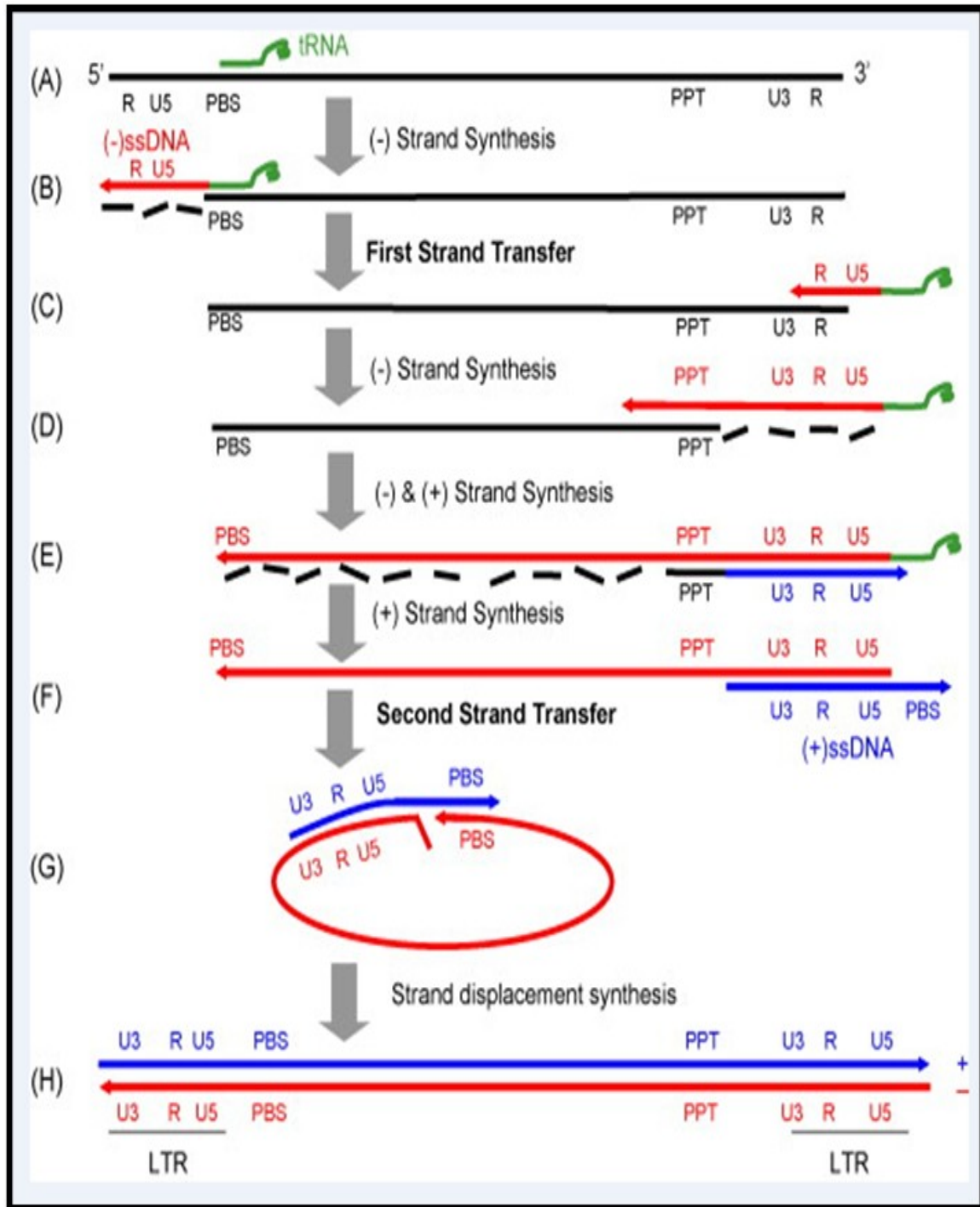


**Figure 6.** Entrée du VIH. 1) Eléments impliqués dans la fusion. 2) Fixation gp120-CD4. 3) Changement de conformation de gp120. 4) Fixation gp120-corécepteur. 5) 2ème changement de conformation de gp120 et libération de gp41. 6) Exposition de gp41. 7) Insertion du peptide de fusion de gp41 dans la membrane cellulaire. 8) Repliement des deux domaines HR1 et HR2 de gp41. 9) Rapprochement et fusion des deux membranes. Schéma adapté du site <http://www.youtube.com/watch?v=f57KvMfCN14&feature=related>

### 1.3.2.2 Transcription inverse, décapsidation et intégration

Une fois dans le cytoplasme, la transcription inverse de l'ARN viral s'amorce dans la capsidie contrairement au modèle couramment exposé du cycle du VIH qui stipule que le virus perd immédiatement sa capsidie (décapsidation) après son entrée dans le cytoplasme. En effet, il est estimé que chaque virion contient seulement 80 à 120 copies de TI<sup>51</sup>. Dans ce cas, une décapsidation après la fusion entraînerait une forte dilution de l'enzyme dans le cytoplasme cellulaire, rendant ainsi la rétrotranscription impossible<sup>52</sup>. Le maintien de la capsidie dans le nouveau modèle permet d'avoir une haute concentration de la TI, mais assure aussi un espace restreint au processus de la rétrotranscription ou la probabilité de rencontre des différents éléments impliqués devient plus grande. D'ailleurs, plusieurs études ont montré clairement que le virus garde sa capsidie jusqu'à l'import nucléaire du complexe de pré intégration<sup>53, 54</sup> où il perd sa capsidie devant les pores du noyau, du fait de sa taille (100-120 nm de long et 50-60nm de large) qui excède celle du pore nucléaire (25-30 nm de large)<sup>52</sup>.

La transcription inverse fait intervenir les deux activités enzymatiques (polymérase et RNase H) de la TI. Elle est initiée à l'extrémité 3' à l'aide d'une amorce cellulaire lysyl-tRNA (Lys3) qui reconnaît et s'hybride à un site appelé « *Primer Binding Site* » ou PBS. Ensuite, l'activité ADN polymérase ARN-dépendant de la TI permet l'élongation de cette amorce jusqu'à l'extrémité 5' couvrant la zone U5 et R. Cette élongation est suivie d'une hydrolyse par la RNase-H de la partie du génome transcrit en ADN. L'ensemble du processus est résumé dans la figure 7<sup>55</sup>.

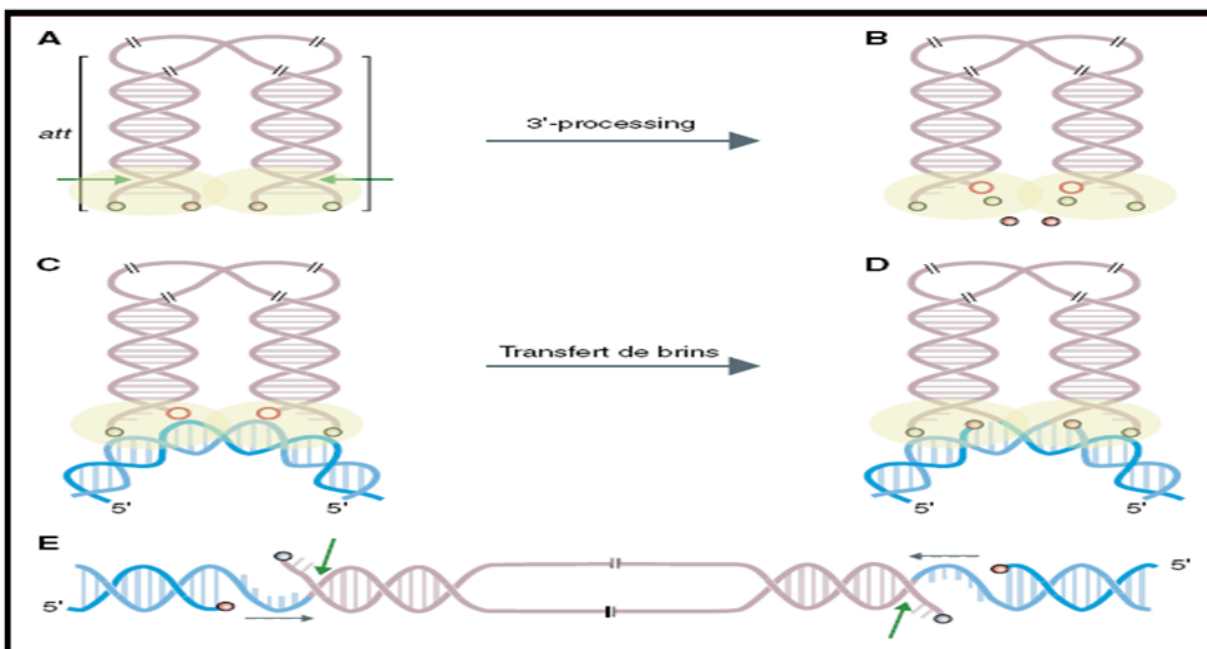


**Figure 7.** Schéma représentatif des étapes de la transcription inverse. Tiré de Basu et al. *Virus Res* 2008<sup>55</sup>. Avec l'autorisation d'Elsevier Publisher.

Suite cette étape, se forme le complexe de préintégration appelé PIC, composé de l'ADN double brin viral et d'un certain nombre de protéines virales dont MA, RT, IN et Vpr<sup>56</sup>. Le PIC contenu dans la capsid se déplace vers le noyau, avec l'aide des microtubules et microfilaments d'actine de la cellule<sup>57, 58</sup>. Une fois au niveau de la membrane nucléaire, la capsid se détache du filament d'actine pour s'amarrer aux pores nucléaires. En ce moment, le virus perde sa capsid (décapsidation), car sa taille de 100 à 120 nm excède celle des pores estimée à 25-30 nm<sup>36</sup>. Le PIC gagne ainsi le noyau avec l'aide des séquences de localisations nucléaires situées sur les protéines MA, IN et par Vpr<sup>59</sup> pour subir le processus d'intégration, catalysé par l'intégrase (IN) grâce à son activité de recombinaison (couper-coller). Ce processus se passe en deux étapes: le 3' *processing* et le transfert de brin. Au cours du 3' *processing*, l'IN se fixe sur une séquence courte se trouvant aux deux extrémités des LTR et fait une coupure de deux nucléotides à chaque extrémité 3'OH de l'ADN viral. Ensuite, le PIC est prêt pour une intégration dans le génome de la cellule, encore appelé étape de transfert de brin. L'IN va insérer en même temps les deux extrémités 3'OH issu du 3'-*processing* de l'ADN viral dans le génome cellulaire, ce qui conduit à la formation du provirus, qui adopte une structure chromatiniennne. Le processus d'intégration est résumé dans la figure 8<sup>60</sup>.

### 1.3.2.3 Traduction et assemblage

Cette étape particulièrement régulée permet la synthèse des ARN messagers viraux. La transcription commence à partir de l'extrémité 5' du LTR qui servira de promoteur pour initier ce processus assuré par l'ARN polymérase ADN-dépendant cellulaire ou polymérase II.



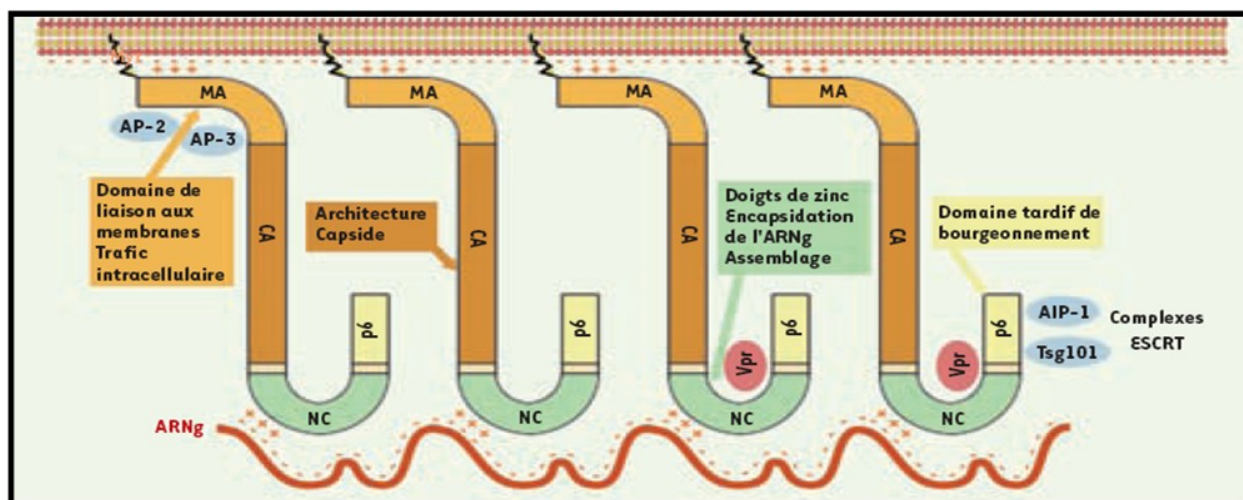
**Figure 8.** Processus d'intégration. A, B) Fixation de l'intégrase au niveau des LTR et 3'-processing avec coupure de deux nucléotides formant des 3'OH libre. C,D) Insertion de l'ADN virale dans le génome cellulaire. E) Réparation des brèches<sup>60</sup>. Tiré de Pommier Y et al. Nat Rev Drug Discov 2005. Avec l'autorisation de Nature Publishing Group.

La transcription se fait d'abord lentement et fournit des ARNm multiépissés qui sont générés à partir du transcrit primaire codant pour les protéines d'expression précoce comme Tat, Rev et Nef. La protéine Tat ainsi produite retourne dans le noyau et améliore considérablement la transcription<sup>61, 62</sup> en reconnaissant une séquence appelée TAR sur le LTR et active ainsi la transcription. À ce stade, ce sont des ARNm non épissés codant pour les précurseurs gag et gag-pol, ainsi que des ARNm peu épissés codant pour des protéines Env, Vif, Vpu et Vpr, qui sont produits. Le transport de ces ARNm non épissés ou peu épissés est assuré par la protéine Rev.

Ces ARNm sont épissés dans le cytoplasme et traduits par les ribosomes cellulaires pour donner les différentes protéines virales.

L'assemblage est un processus qui a lieu au niveau de la membrane. Cependant, les études divergent entre les membranes des compartiments intracellulaires<sup>63, 64</sup> et la membrane plasmique<sup>65-67</sup>. Il commence la production des précurseurs de protéines structurales et enzymatiques gag et gag-pol. Dans ce processus le précurseur gag joue un rôle central et sa seule présence permet la production des pseudoparticules virales<sup>68</sup>. Le précurseur gag est composé de plusieurs domaines. Sa partie N-terminale héberge le domaine de la protéine de matrice (MA), au centre le domaine de la protéine de la capsidie et du côté C-terminal le domaine de la nucléocapsidie et de la protéine P6. L'assemblage est initié au niveau N-terminal du fait de la présence d'un résidu myristate qui interagit avec la bicouche lipidique de la membrane. Cette interaction est stabilisée par une interaction supplémentaire établie entre les résidus basiques de MA de charges positives et les phospholipides de la membrane de charges négatives (figure 9)<sup>69</sup>. Le domaine nucléocapsidie porte aussi des résidus de charges positives qui montrent une forte affinité avec les charges négatives présentes sur l'ARN génomique. Cette affinité favorise les interactions gag-gag nécessaires à la formation de la capsidie, car il faut jusqu'à 1500 unités de gag pour un virion infectieux<sup>70</sup>. Une fois ces différents éléments assemblés, les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 sont les dernières à être transportées vers la membrane cellulaire pour rejoindre le complexe d'assemblage. Leur transport se fait par voie de sécrétion dépendant d'AP-2<sup>71</sup>. Ensuite, le domaine P6 interagit avec la membrane via les protéines cellulaires Tsg101 et AIP1 nécessaires pour le bourgeonnement et la libération des particules immatures<sup>69</sup>. La maturation est assurée par la protéase virale qui clive les précurseurs de gag et gag-pol en

produisant des protéines virales matures. Ce processus est suivi d'une organisation de ces protéines afin de produire une particule virale infectieuse.



**Figure 9.** Schéma représentatif de l'Assemblage du VIH Tiré de Antoine et al. *Medicine/Sciences* 2008<sup>69</sup>. Avec la permission de Jean-Luc Darlix.

### 1.3.3 Diversité du VIH : Causes et conséquences

L'évolution rapide est une des caractéristiques du VIH et sa grande diversité est sans doute l'une des raisons clés de son succès<sup>72</sup> à s'établir chez l'espèce humaine et à causer une pandémie. Il est établi aujourd'hui par des études phylogénétiques que plusieurs événements de transmission interspèce sont à l'origine de l'introduction des VIH-1 groupes M, N, O et du VIH-2 dans la population humaine<sup>73, 74</sup>. Ainsi, depuis la transmission de ces deux types de VIH et des trois groupes de VIH-1, ces virus n'ont pas cessé d'évoluer et de se diversifier dans le règne humain. Présent seulement depuis moins d'un siècle, le VIH semble être le virus le plus variable avec une

variation génétique de plus 30% comparativement au 5% du virus influenza présent depuis 2000 ans<sup>75</sup> et les 5-10 % pour le virus de l'hépatite C<sup>76</sup>.

### 1.3.3.1 Diversité du VIH

Depuis l'introduction du VIH chez l'homme à partir des virus simiens (figure 10)<sup>77</sup>, il a évolué en différents groupes phylogénétiques (sous-type) qui sont quelques fois classés en sous sous-types et 51 formes recombinantes circulantes ou « *circulating recombinant forms* » (CRF)<sup>78</sup>, témoignant de la grande diversité du VIH. Cette classification est basée sur les variations des séquences du gène *env* et du gène *gag*. Les sous types sont tous équidistants les uns des autres avec une différence de 25 à 35% alors qu'au sein d'un sous-type, la différence est moins de 20%<sup>79</sup>. Toutefois, il faut noter que cette différence peut varier selon le gène étudié. La classification du VIH montre deux types de VIH: VIH-1 et VIH-2.

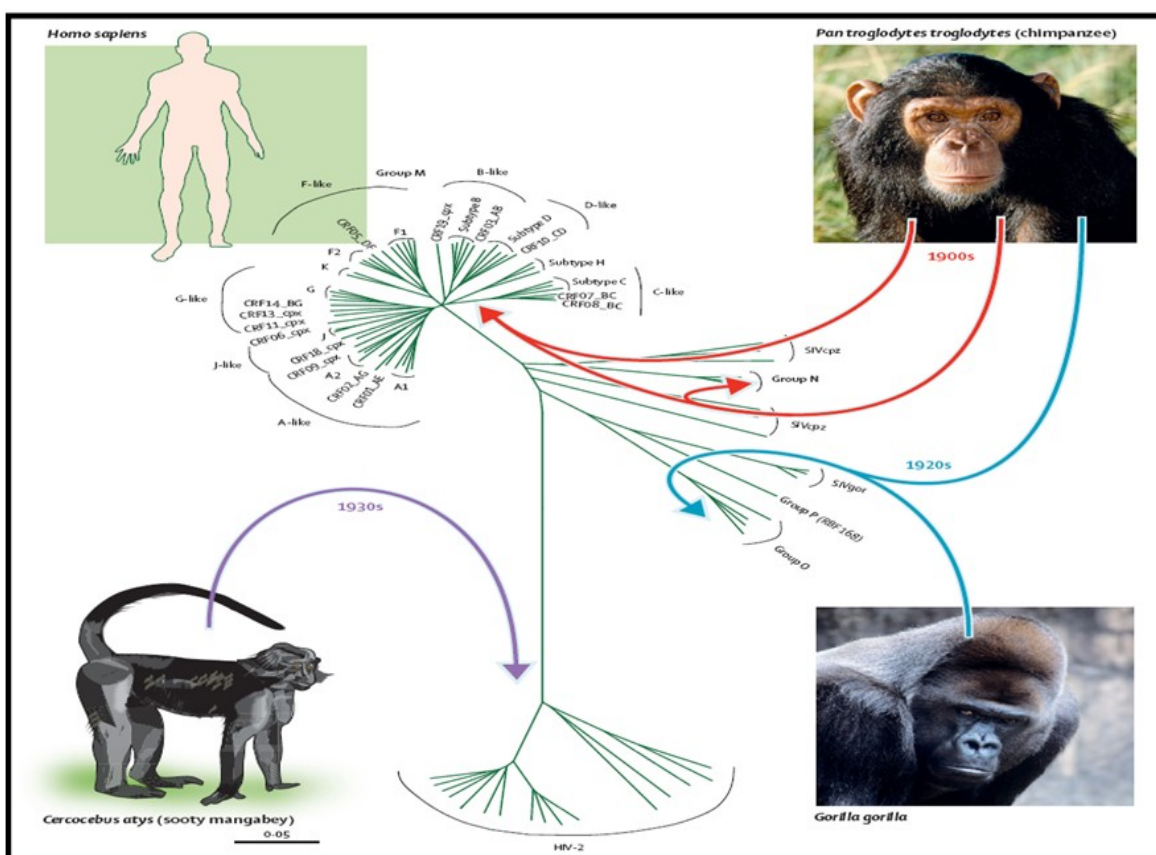
Le VIH-2 aurait été transmis à l'homme entre 1940 et 1945 à partir du singe Mangabé (SIVsm)<sup>73</sup>. Dès lors, il a évolué en 7 sous types de A à G mais la quasi-totalité des infections sont causées par le type A ou B<sup>80</sup>. Il est moins diversifié que le VIH-1, probablement à cause de sa propagation lente où il reste généralement fréquent en Afrique de l'Ouest, avec Son épiceutre situé en Guinée Bissau<sup>77</sup>. Actuellement, moins d'un million de personnes sont infectées par le VIH-2 dans le monde<sup>81</sup>. Sa faible transmissibilité et pathogénicité entraînant une progression plus lente de la maladie chez les personnes infectées pourrait être défavorable à une diversification.



Contrairement au VIH-2, le VIH-1 est plus diversifié avec trois grands groupes: M, N et O. Récemment, un nouveau virus a été révélé chez une femme camerounaise. Ce virus semble appartenir au VIH-1 mais suffisamment distinct des autres groupes du VIH-1. Ainsi, il a été nommé groupe P<sup>82, 83</sup>. Il est établi à ce jour qu'au moins trois événements indépendants de transmission entre 1910 et 1950, à partir de Chimpanzés (SIV cpz), ont abouti à l'introduction chez l'homme des groupes M, N et O du VIH-1<sup>74</sup>. Par ailleurs, les gorilles pourraient jouer un rôle dans la transmission du groupe O à l'homme<sup>84</sup>. Le groupe O pour « *outlier* » présente une homologie de seulement 50% avec le groupe M au niveau du gène de l'enveloppe<sup>85, 86</sup>. Il a une propagation limitée avec une endémie située seulement au Cameroun et dans quelques pays voisins. Une étude effectuée sur 14682 échantillons provenant de 12 pays d'Afrique a montré que sa prévalence variait de 2,1 à 0,07% respectivement pour le Cameroun et le Sénégal<sup>87</sup>. Malgré ce fait, le groupe O montre une grande diversité. À ce jour, les analyses génétiques sont arrivées à les grouper en trois sous types A, B et C. Cependant, plusieurs souches restent encore non classées. Quant au groupe N (non Major and non Outlier), il a reçu très peu d'attention. Il a été isolé chez un nombre très limité de patients camerounais<sup>88, 89</sup>. Ce qui fait que ce virus reste à l'écart des études et aurait probablement une diversité plus faible. Par contre, le groupe M, pour « *Major* » a beaucoup évolué et est responsable de la pandémie du SIDA. Il est subdivisé en 9 sous-types : A, B, C, D, F, G, H, J et K. Certains des ces sous-types sont à leur tour subdivisés en sous sous-type. Par exemple, on peut noter les cas du sous-type A (A1, A2, A3, A4) et le sous-type F (F1 et F2)<sup>90</sup>.

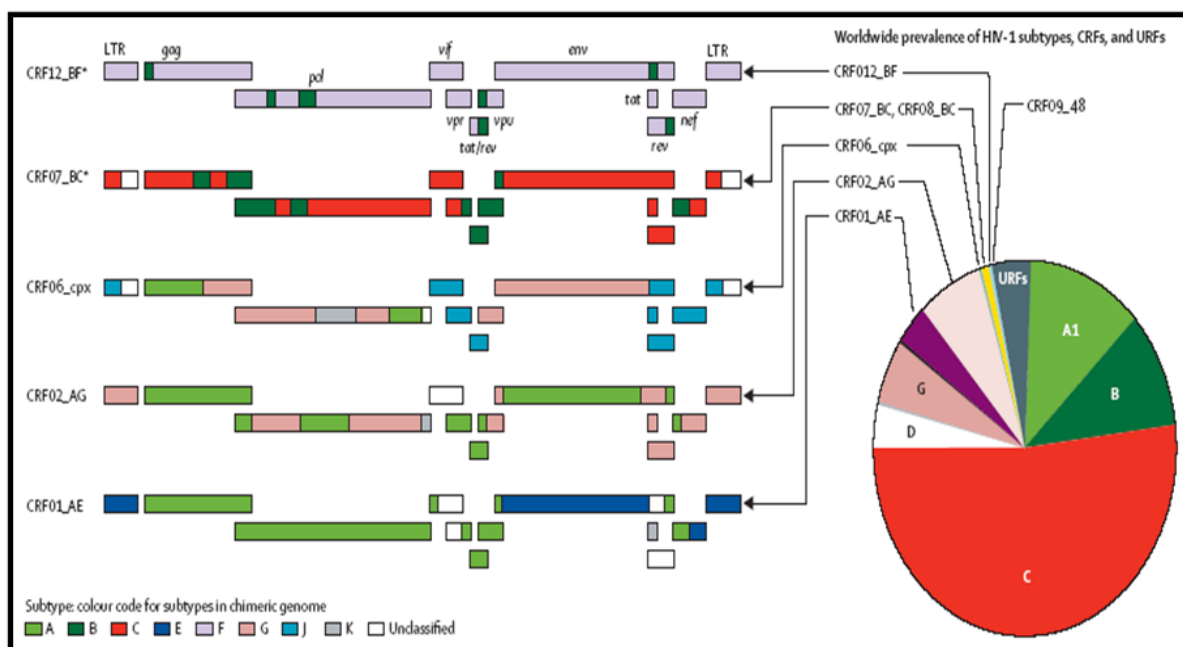
Comme si cela n'était pas suffisant, l'accès au séquençage du génome entier montre que certains isolats sont des vraies mosaïques appartenant à des sous-types différents. Ces isolats sont

regroupés par la suite en CRF. Cette définition est valable seulement quand la même forme recombinante est retrouvée chez au moins trois personnes contrairement à la forme recombinante unique ou URF (Unique Recombinant form) qui est retrouvée chez une seule personne. Aujourd'hui, 51 CRF ont été recensés<sup>78</sup> parmi lesquels les CRF02\_AG et CRF01\_AE sont majoritaires. En effet, dans la classification des sous-types du groupe M, on observe que les lettres E et I sont absents. Auparavant, il y avait des isolats classés E et I, mais on s'est vite rendu compte avec le séquençage qu'ils étaient des mosaïques.



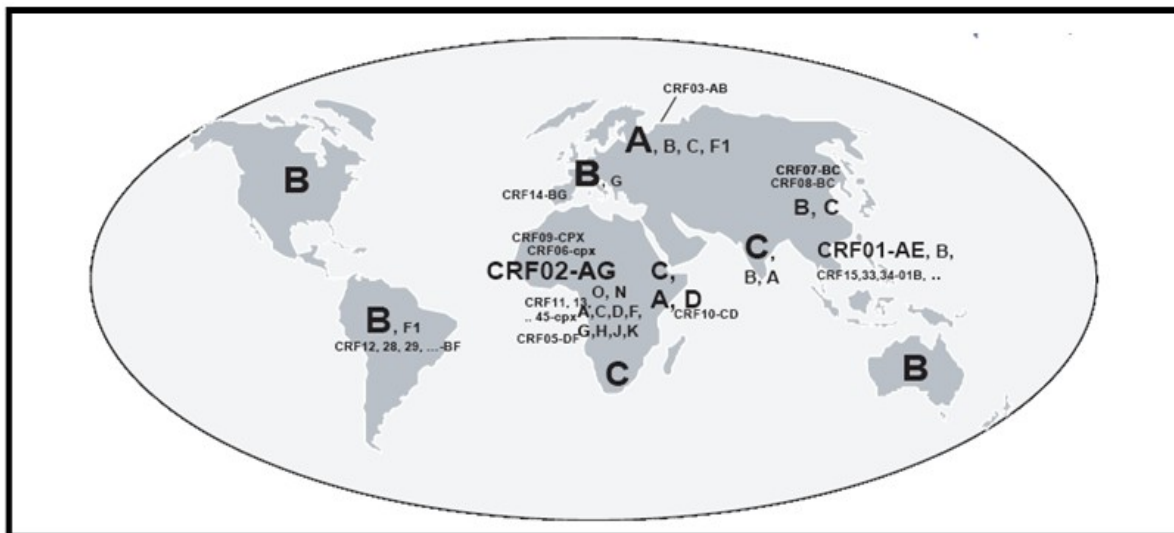
**Figure 10.** Diversité génétique, VIH-1, VIH-2, SIV et la chaîne de transmission inter espèce. CRF= formes recombinantes circulantes, cpz = Chimpanzé, gor= Gorille. Cpx = Complexe, SIV= virus de l'immunodéficience simien. Tiré de Tebit et Arts. Lancet Infect Dis 2011<sup>7760</sup>. Avec la permission d'Elsevier Publisher.

En réalité, tous les sous-types classés E étaient des recombinants de sous-types A et E et sont maintenant appelés CRF01\_AE. Les isolats classés auparavant sous type I, dont l'isolat 94CY032 de Chypre<sup>91</sup> étaient aussi des mosaïques complexes recombinant plusieurs sous-types. Ainsi, ces virus sont aujourd'hui classés CRF04\_cpx<sup>92</sup>. Par ailleurs, la souche isolée au Nigeria appelée IbNg d'Ibadan était initialement classée comme une lignée divergente du sous-type A. Par contre, le séquençage du génome complet montre qu'il s'agit d'une mosaïque avec des séquences alternantes de sous-types A et G<sup>93</sup> (figure 11)<sup>77</sup>. Par la suite, des isolats similaires ont été retrouvés dans différentes régions d'Afrique et ces virus ont été appelés CRF02\_AG.

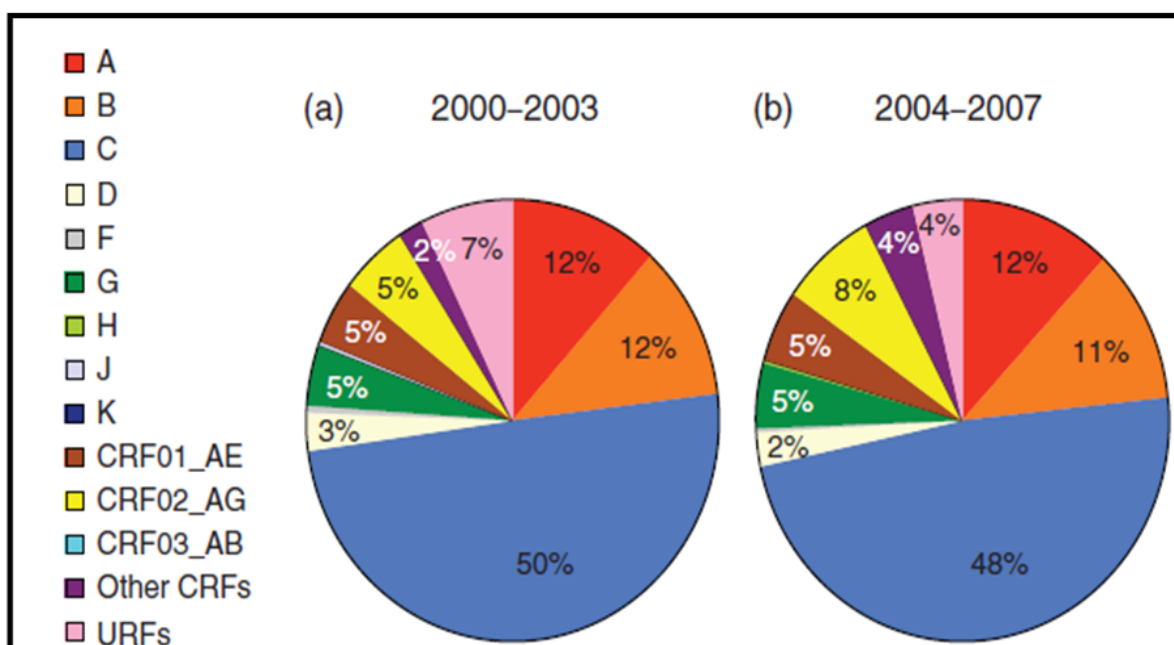


**Figure 11.** Structure mosaïque et prévalence du VIH-1 et des formes recombinantes les plus répandues dans le monde. LTR = Long Terminal Repeat, CRF = Circulating Recombinant form, URF = Unique Recombinant Form. Tiré de Tebit et Arts. *Lancet Infect Dis* 2011<sup>77</sup>. Avec la permission d'Elsevier Publisher.

La grande diversité du VIH s'observe également dans sa distribution géographique (figure 12)<sup>94</sup>. Certains sous-types restent confinés dans certaines régions, d'autres dans quelques pays, mais tous les sous types sont observés en Afrique. Par ailleurs, à l'image du virus lui-même, le niveau d'implication des sous types dans la pandémie est évolutif (figure 13)<sup>95</sup>. Par exemple, le sous-type C perd légèrement du terrain alors que la fréquence du CRF02\_AG augmente dans le temps. Globalement, les sous-types C, A, B, G et D sont les plus prédominants. Pour les formes recombinantes, c'est les CRF02\_AG et CRF01\_AE qui sont fréquemment observées dans les infections<sup>95</sup>. Le sous-type C est à lui seul responsable de 48% des infections. Il est prédominant dans les régions d'Afrique du Sud, en Inde et l'Afrique de l'Est. Le sous-type A représente 12% des infections. Il est fréquent en Afrique de l'Est et du Centre. Le sous-type B est responsable de 11% des infections. Il est observé dans les pays industrialisés notamment, l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud, l'Europe, l'Australie et les Caraïbes. Le sous-type G, responsable de 5% des infections est majoritairement présent en Afrique Centrale. Quant au sous-type D, il est aussi majoritairement présent en Afrique de l'Est et Centrale et ne fait que 2% des infections. Le CRF01\_AE prédomine en Asie et en Afrique Centrale et est responsable de 5% des contaminations par le VIH. Le CRF02\_AG est surtout observé en Afrique de l'Ouest, mais aussi dans d'autres régions d'Afrique avec à son compte 8% des infections. Les autres CRF et URF sont responsables pour chacun de 4% des infections. Les groupes O, N et P restent confinés au Cameroun et pays limitrophes. Parmi ces trois groupes, le groupe O est le plus fréquent avec 1% des infections par le VIH<sup>94</sup>. Les formes recombinantes CRF02\_AG sont de plus en plus observées en Europe. En effet, le monde devient un gros village, ce qui est favorable à une propagation plus rapide des sous-types qui continueront sûrement à se combiner et à se diversifier.



**Figure 12.** Distribution géographique de VIH-1 et formes recombinantes dans le monde. Tiré de Peeters et al. *Microbil Infect* 2010<sup>94</sup>. Avec la permission de John Wiley and Son.



**Figure 13.** Mise à jour 2011 de l'évolution dans le temps de la fréquence des sous types dans la pandémie VIH-1. Tiré de Hemelaar et al. *AIDS* 2011<sup>95</sup>. Avec la permission de Wolters Kluwer Health.

### 1.3.3.2 Causes de la diversité

La diversité du VIH résulte de la combinaison des mutations ponctuelles, des substitutions et de la recombinaison génétique. Les mutations ponctuelles sont introduites dans l'ADN viral grâce à l'erreur de la TI ou par l'activité de l'APOBEC3<sup>96</sup>. Ces processus entraînent au moins une mutation dans le génome viral par génération<sup>97</sup>, ce qui conduit à la notion de mer de quasi-espèces dans laquelle tous les virus sont différents les uns des autres.

#### 1.3.3.2.1 Erreur de la transcriptase et activité de l'APOBEC3

La transcriptase inverse est une enzyme qui assure la synthèse de l'ADN viral à partir de l'ARN viral. Malheureusement, comparativement aux polymérases cellulaires, la TI ne possède pas de mécanisme de correction des erreurs. Ainsi, au cours de la transcription inverse, les nombreuses erreurs non réparées commises sont estimées à 5 à 10 par cycle de réplication, générant plusieurs variantes virales. En plus, la grande capacité du virus à se multiplier, estimée à  $10^{10}$  par jour<sup>98</sup>, est un facteur favorable à la production des mutants. Ainsi, plus la multiplication est grande, plus le nombre de virus mutant produit est élevé. L'APOBEC3 est un facteur cellulaire qui appartient à la famille de cytidine désaminase<sup>99</sup>. Ce sont des enzymes qui introduisent des mutations à l'ARN avec changement des cytosines (C) en uracile (U) lors de la rétrotranscription des rétrovirus, dont le VIH. Le résultat de ce changement est une mutation des nucléotides G en A sur l'ADN viral. Ce processus se passe de façon aléatoire sur l'ensemble du génome viral et entraîne in fine l'apparition de variantes virales<sup>100</sup> avec plusieurs points de mutations. Le résultat de cette opération est une hypermutation au niveau de l'ADN viral donnant ainsi des virus défectueux<sup>101</sup> incapables d'infecter d'autres cellules.

Parmi les APOBEC, le 3G est le plus connu. Il existe sous deux formes : une forme de faible masse moléculaire (LMM) et une autre de haute masse moléculaire (HMM). Il est établi que seule la forme LMM possède une activité antivirale<sup>102</sup>. L'expression d'A3G dans les cellules ne lui assure pas une activité antivirale contre le VIH, car il agit au moment de la transcription inverse. De ce fait, il doit être emballé dans les virions en formation pour pouvoir agir. Sa présence dans les virions est favorisée par son affinité à interagir avec l'ARN (APOBEC3G-ARN) et la protéine gag (APOBEC-gag)<sup>103-105</sup>. Par contre, son effet est contré par la protéine virale vif. En effet, la présence de vif permet de recruter APOBEC3G par les ubiquitines ligase afin de promouvoir sa dégradation par le protéasome. Ceci entraîne la formation de virions exempts d'APOBEC, supprimant ainsi son rôle de facteur de restriction dans les cellules nouvellement infectées. Par contre, en absence de vif, APOBEC3G est incorporé dans les nouveaux virions<sup>103, 104</sup>. Les erreurs de la TI et l'effet de l'APOBEC conduisent à des mutations ponctuelles qui peuvent aussi s'accumuler au fil des générations et contribuent ainsi à creuser un écart génétique important avec les virus mères. Il en résulte des virus génétiquement distincts, avec une distance génétique plus ou moins considérable. Contrairement aux mutations ponctuelles qui sont à la base de la notion de quasi-espèce où les variantes diffèrent de quelques mutations sur leurs génomes, les recombinaisons contribuent à l'apparition de nouvelles souches avec des distances génétiques importante comme les CRF.

#### **1.3.3.2.2 Recombinaison**

La recombinaison est un processus que plusieurs virus utilisent pour assurer leurs diversifications génétiques. Dès les années 1970, les travaux sur les rétrovirus animaux ont permis de montrer

des réassortiments de virus dont les variantes semblent ne pas être reliées<sup>106</sup> à cause de leur grande distance génétique. Les premières expériences sur le VIH-1 montrent rapidement des preuves de recombinaison. Deux souches de virus LAI avec des mutations au niveau de la protéase (48V, 71V, 75I et 81T) et HXB2d avec des mutations de résistance à la zidovudine (D67N, K70R, T215F et K219Q) ont été utilisées pour la coinfection des cellules MT-2. Après 2 à 4 passages sous pression zidovudine, il a été montré par digestion enzymatique que la majorité des virus était des recombinants LAI/HXB2d<sup>107</sup>. Par ailleurs, une autre expérience a montré une fréquence élevée de recombinaison entre des souches différentes de VIH-1. Dans cette expérience, deux clones distincts NL432 et HAN2 ont été utilisés pour la coinfection simultanée d'une lignée lymphocytaire T M8166 avec  $4 \times 10^4$  TCID50 de chaque clone. Après formation de syncytium, l'analyse des séquences par PCR a montré que 20% de la population virale était formée de recombinant NL432/HAN2<sup>108</sup>. Ceci suggère que la recombinaison est un processus fréquent. En outre, la recombinaison a été facilement observée chez les singes lors de coinfection avec le virus simien de l'immunodéficience (SIV), démontrant ainsi que les virus de type lentivirus pourraient se recombiner *in vivo*<sup>109, 110</sup>. Chez l'homme, l'évidence d'une recombinaison a été rapportée dans un suivi de cohorte au Kenya. Une femme infectée par un virus de sous type A en 1986 a montré une forme recombinante A/C en 1997<sup>111</sup>.

La recombinaison est fréquente chez les rétrovirus. Néanmoins, elle demeure un processus complexe qui requiert la satisfaction d'un ensemble de conditions pour se réaliser. La première étape est la présence de deux ARN distincts dans la cellule. En effet, la recombinaison se passe au moment de la transcription inverse qui se déroule dans la capsid. Compte tenu de la taille des pores de la capsid, un autre génome n'a pas accès à cette cage. La présence d'ARN distincts



dans les cellules est consécutive à la coinfection des patients et des cellules elles-mêmes. La coinfection des patients a fait l'objet de plusieurs études, incluant la description de cas de surinfections des patients et même des événements de triple infection<sup>112-115</sup>. Quant à la coinfection des cellules, elle a été également ramenée par plusieurs études. Par exemple, des études par hybridation in situ ont montré qu'une cellule peut contenir plus de quatre provirus distincts<sup>116, 117</sup>. D'autres études sur les synapses virologiques ont montré des cas de transferts de virus de cellule à cellule au niveau des synapses<sup>118, 119</sup>. Une fois ces deux conditions réalisées, les différents génomes doivent être intégrés dans le génome de la cellule hôte, transcrits séparément en ARNs génomiques distincts, mais assemblés dans la même capsid afin d'aboutir aux premiers virions pseudodiploïdes et infectieux (figure 14)<sup>97</sup>.

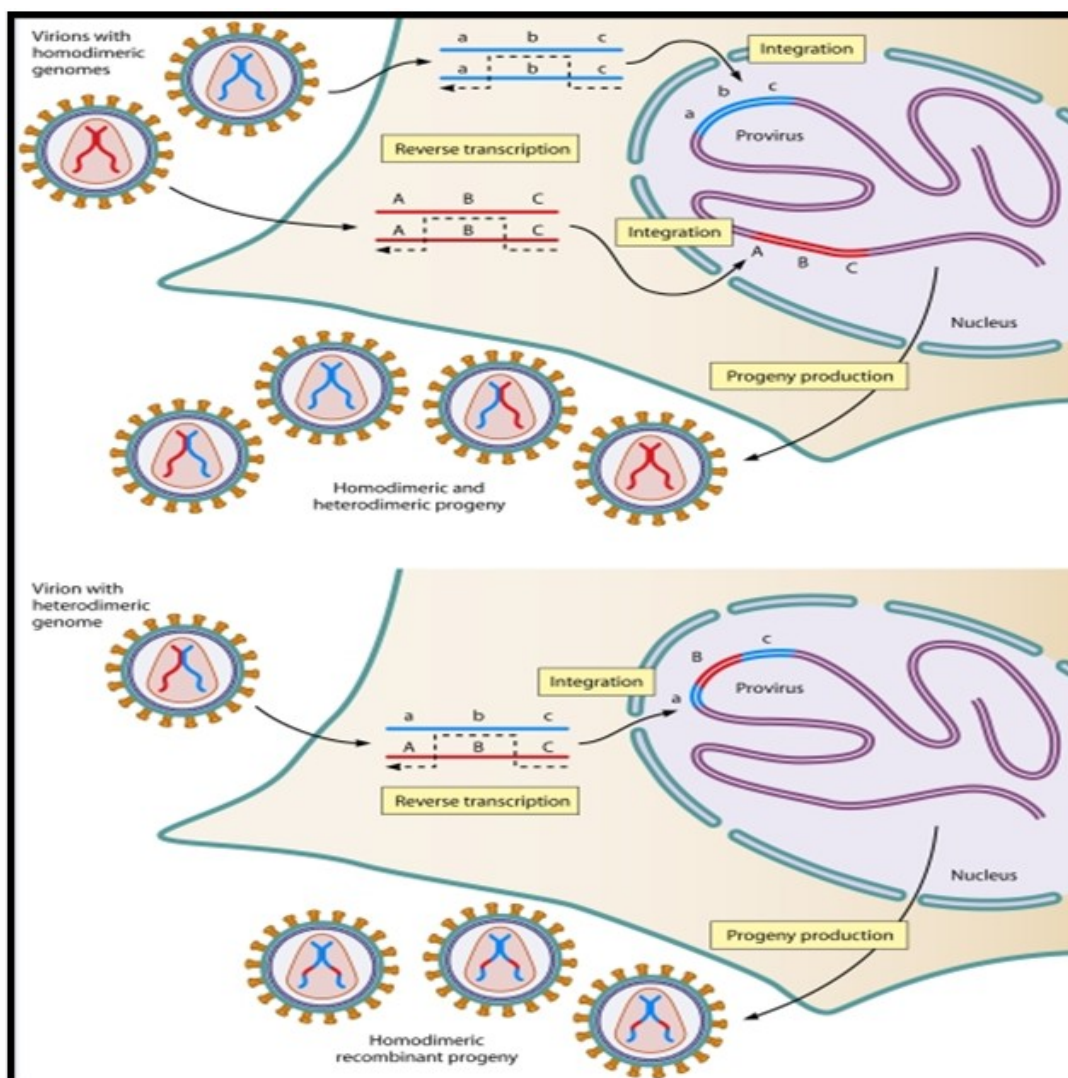
L'intégration des souches différentes dans le génome cellulaire et leur transcription est un processus normal, mais leur assemblage dans une même capsid peut poser un problème. En effet, l'assemblage de l'ARN génomique (ARNg) se fait sous forme de dimère. La dimérisation est un processus complexe<sup>120</sup>. En effet, chaque ARNg est capable de se dimériser, aboutissant à des homodimères ou des hétérodimère<sup>121</sup>. L'encapsidation des hétérodimères est l'une des conditions de la recombinaison. Certaines hypothèses suggèrent que la dimérisation se fait de façon aléatoire<sup>122, 123</sup>. Cependant, il a été montré que la concentration locale de l'ARNg, la compatibilité des séquences et la protéine de nucléocapsid (NCp7) jouent un rôle important dans le processus<sup>124</sup>. D'ailleurs, il est connu que le site d'initiation de la dimérisation (DIS) est fortement impliqué dans la dimérisation<sup>124</sup> par appariement des bases au niveau des séquences palindromiques, montrant ainsi l'importance de la compatibilité entre ARNg assemblés. Cependant, chez certains sous-types du groupe M, la diversité des séquences trouvées au niveau

de la région de dimérisation DIS sur l'ARNg n'a pas empêché l'assemblage d'ARNg divergents<sup>125</sup>. Par exemple, les séquences palindromiques de DIS des sous types B et A du VIH sont très différentes et théoriquement incapables de se dimériser<sup>97</sup>. Toutefois, les données cliniques montrent une recombinaison entre ces sous types. Par exemple, la forme recombinante CRF03\_AB (dont la souche de référence est Kal153) observée majoritairement chez les patients à Kaliningrad<sup>126</sup> est issue de la combinaison des souches A et B. Il est donc clair que ces différences au niveau de DIS n'empêchent pas entièrement la dimérisation. L'ensemble des conditions préalables à la recombinaison, une fois réalisé, aboutit à un virion pseudodiploïde ou hétérozygote avec un hétérodimère d'ARNg prêt pour le processus de recombinaison qui se passe au moment de la transcription inverse assurée par la TI.

#### **1.3.3.2.1 Mécanismes de recombinaison**

À ce jour, plusieurs théories sur le mécanisme de recombinaison ont été avancées. Mais dans tous les cas, le processus se passe au moment de la transcription inverse lors de la synthèse soit du premier brin<sup>127</sup> soit du second brin d'ADN<sup>128-130</sup>. En effet, le mécanisme de transfert de brin est lié à un arrêt dans l'avancement de la TI au moment de la transcription inverse. Cet arrêt force la RT à passer sur un brin d'ARN dit donneur à un autre disponible dit accepteur pour continuer la synthèse. Les causes de cet arrêt sont nombreuses. La première cause avancée fut la présence des cassures dans l'ARN<sup>131</sup>. En effet, Coffin et al ont établi que le génome des rétrovirus présente beaucoup de discontinuités (fragmentation) et que ces anomalies pourraient empêcher la TI de continuer la synthèse sur la matrice d'ADN naissant. Une autre étude réalisée

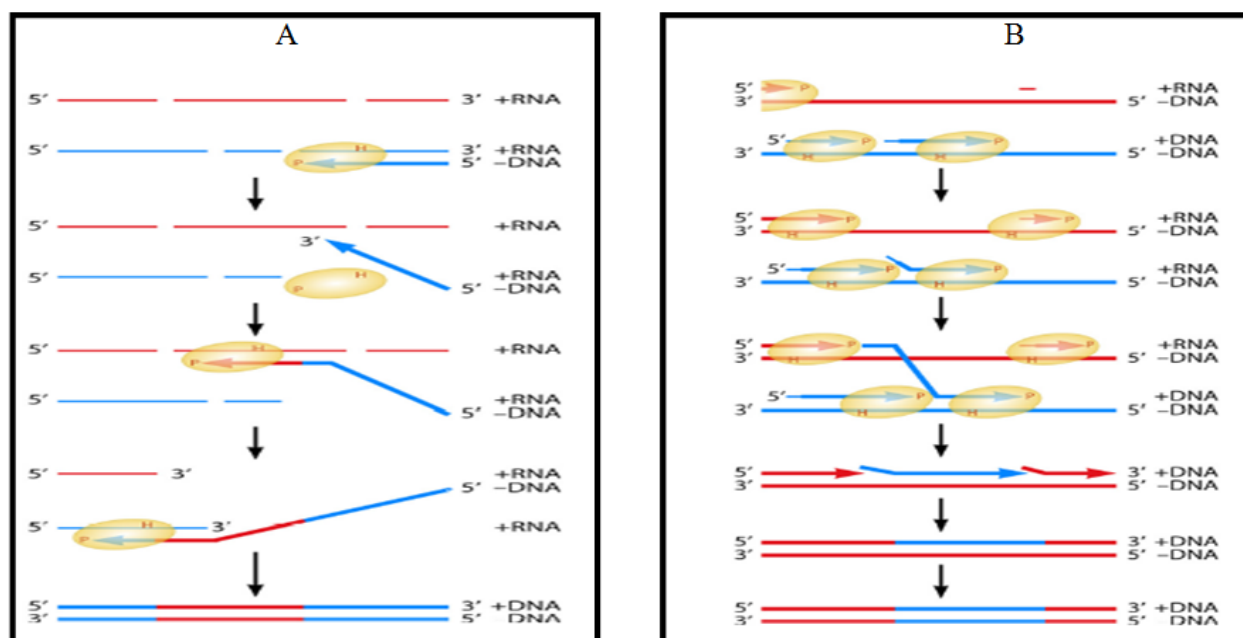
par Sanchez et al a montré que 27 à 66% de virus obtenus à partir des PBMCs des patients VIH+ présentaient de larges délétions au centre du génome<sup>132</sup>.



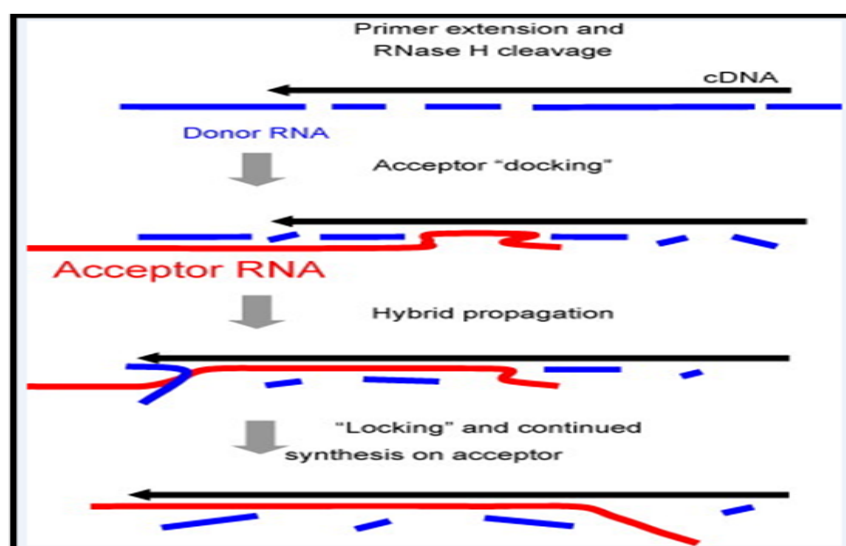
**Figure 14.** Conditions requises pour la recombinaison. A) Infection par deux virus génétiquement différents, intégration et assemblage des deux virus dans la capsid avec production de virion infectieux. B) Infection d'une cellule par ce virion, recombinaison et production de virus recombinés. Tiré d'Onafuwa-Nuga and Telesnitsky. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009<sup>97</sup>. Avec la permission d'American Society for Microbiology.

Ainsi, la présence de ces cassures pourrait forcer le transfert de la TI d'un brin à un autre appelé « choix de copie forcée » (figure 15A)<sup>97</sup>. Une autre cause d'arrêt de la TI est la forte présence de sites de pause dans certaines régions d'ARNg<sup>133, 134</sup> (figure 15B)<sup>97</sup>. Les sites de pause sont des structures secondaires ou des types de séquences (riches en G et C) sur le génome qui agissent comme des arrêts ou « *stop* » et empêchent l'élongation du brin naissant par la TI. Plusieurs études *in vitro* ont montré que cet arrêt oblige la TI de changer de matrice, permettant ainsi une fréquence élevée de recombinaison<sup>133-135</sup>. Par exemple, l'étude de Wu et al, utilisant un modèle de transcription *in vitro* avec deux brins différents, dont un comportant des insertions et substitutions mimant la pause, a montré un taux de recombinaison de 30%. Ce résultat a été confirmé par une diminution du transfert de brin, quand les sites de pause ont été supprimés<sup>135</sup>, montrant clairement l'impact de ces sites de pause dans le processus de transfert de brin.

Un dernier mécanisme de la recombinaison proposé est la théorie de « *megaprimer* » ou invasion (figure 16)<sup>55</sup>. Cette hypothèse est basée sur la dégradation partielle du premier brin déjà copié par l'activité RNase H de la RT. De ce fait, par un processus de complémentarité, un autre ARN peut servir de « *megaprimer* » pour faire une seconde copie, assurant ainsi une recombinaison s'il s'agit de génome différent. Cette théorie a été vérifiée par des expériences de transcription inverse *in vitro* par plusieurs études<sup>136-138</sup>.



**Figure 15.** Mécanisme de recombinaison par transfert de brin. A) Recombinaison par transfert de brin « choix de copie forcée. B) transfert de brin lié à la présence de sites de pauses. Tiré de Onafuwa-Nuga et Telesnitsky. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009<sup>97</sup>. Avec la permission d'American Society for Microbiology.



**Figure 16.** Mécanisme de recombinaison par invasion avec un « megaprimer » (ici en rouge). Tiré de Basu et al. *Virus Res* 2008<sup>55</sup>. Avec la permission d'Elsevier Publisher.

### 1.3.3.2.3 Contribution de la capacité répliquative

Le haut pouvoir de multiplication du VIH, les erreurs de la RT et un haut taux de recombinaison conduisent à la production d'une quantité importante de virus diversifiés. Malheureusement pour ces virus, tous n'ont pas la chance de continuer leur évolution. Certains seront capables de s'adapter au milieu, d'autres par contre ne le seront pas et seront condamnés à disparaître d'où la notion de "fitness". Généralement, la forme sauvage est plus apte à se répliquer.

Plusieurs facteurs liés au virus ou à l'hôte sont impliqués dans le processus de fitness. Parmi les facteurs viraux, nous pouvons citer les recombinaisons et les mutations dues aux erreurs de la RT et la pression médicamenteuse. Certaines recombinaisons et/ou mutations sont bénéfiques pour le virus. Par contre, d'autres sont pénalisantes. Par exemple, il est connu que la mutation M36I entraîne une augmentation de la capacité répliquative<sup>139</sup>, alors qu'une baisse de celle-ci est constatée avec les mutations K65R et M184V<sup>140</sup>. Une perte significative de la capacité répliquative est également observée avec les mutations K103N, Y188L/C et P236L<sup>141</sup>. Parmi les facteurs d'hôte, le plus connu est la pression de sélection immunologique. Le VIH mute rapidement et les épitopes issus des protéines mutantes peuvent échapper au système immunitaire. Les mutations d'échappement sont observées avec l'ensemble des cadres de lecture *gag pol* et *env*<sup>142</sup>. Cependant, toutes les mutations d'échappements ne sont pas non plus bénéfiques pour le virus. Certaines mutations aboutissent souvent aux virus défectueux et d'autres font échouer simplement sa stratégie de camouflage. Ces virus redeviennent visibles et entraînent une activation du système immunitaire<sup>142</sup>.

### 1.3.3.3 Conséquences de la diversité

La diversité virale a des conséquences à différents niveaux: pouvoir pathogène, recherche vaccinale, diagnostic et thérapie. Les conséquences de la diversité sur le traitement seront développées dans la section traitement et résistance.

#### 1.3.3.3.1 Pouvoir pathogène

Il est reconnu que le VIH-2 est moins pathogène que le VIH-1 avec une progression plus lente vers la maladie SIDA<sup>143, 144</sup>. Une étude réalisée au Sénégal auprès de 78 patients VIH-1+ et 136 patients VIH-2 sur 5 ans a montré que la probabilité de survenu du SIDA était faible chez les patients VIH-2+. Parmi les patients VIH-2, 67% avaient progressé au stade du SIDA contre 100% des patients VIH-1<sup>144</sup>. Il a été également observé dans cette étude que le risque de chute des CD4 (<400) était 12 fois plus élevé chez les patients VIH-1 que VIH-2. La transmission sexuelle ou materno-fœtale du VIH-2 est plus faible comparativement au VIH-1. Ceci est probablement dû à une restriction de réplication (faible taux d'ARNm) avec une charge virale faible chez les patients infectés par le VIH-2<sup>145</sup>.

Le sous-type D, comparé à d'autres sous types s'est également avéré différent au niveau de la pathogénèse. Il a été observé dans différentes régions, notamment en Tanzanie et en Ouganda, que le sous-type D ou les formes recombinantes incluant le sous-type D semblent évoluer plus rapidement vers la maladie SIDA et le décès contrairement au sous-type A<sup>146, 147</sup>. L'étude en Tanzanie auprès de 428 femmes a démontré un risque relatif de 2,27 d'avènement de SIDA et la mort avec le sous-type D comparativement au sous type A<sup>146</sup>. Quant à l'étude en Ouganda avec

350 femmes, elle a rapporté un risque relatif de 5,65 pour le sous-type D comparativement au sous-type A<sup>147</sup>. Ces observations ont été récemment confirmées dans une étude randomisée effectuée sur 861 personnes VIH positive<sup>148</sup>.

Par ailleurs, dans un essai randomisé réalisé en Tanzanie auprès de 253 femmes enceintes infectées par les sous-types C, D et A, Renjifo et al ont montré que le sous-type C était fortement associé à un risque de transmission in utero comparativement au sous type A ou D<sup>149</sup>. Ceci pourrait être lié à la capacité de réplication plus élevée des virus de sous-type C<sup>150</sup>. D'ailleurs, dans l'étude en Tanzanie, la charge virale, mais surtout l'ADN proviral étaient supérieur chez les femmes infectées avec le sous-type C et qui ont transmis le virus in utero comparé à celles infectées par un sous-type A ou D. Il est établi que l'ADN proviral est un facteur prédictif plus fort que la charge virale dans la transmission in utero<sup>151</sup>, car l'infection in utero se fait plus par le biais de contact cellules-cellules<sup>152</sup>.

#### **1.3.3.3.2 Diagnostic**

Le diagnostic du SIDA a beaucoup souffert de la grande variabilité du VIH. Jusqu'en 2004, il n'existait aucun test de charge virale pour le VIH-1 de groupe O. Les trousse commerciales pour les autres sous-types ne fonctionnaient pas sur le groupe O car les amorces ne reconnaissaient pas ce groupe. Avec le temps, quelques laboratoires ont développé des techniques maison<sup>153</sup> qui ont souffert du problème de faux négatif. Bien que les outils de diagnostic s'améliorent et essayent de s'adapter à l'évolution du virus, le diagnostic de certains groupes et sous-types demeure encore problématique. Des progrès considérables ont été réalisés



pour le diagnostic du groupe M du VIH-1 et le VIH-2 ainsi que pour la mesure de la charge virale (CV) du groupe M du VIH-1. Quatre principales compagnies ont développé des techniques pour le test de CV: Roche, Abbott, Biomerieux et Siemens<sup>154</sup>.

- La compagnie Roche a développé deux tests de quantification du VIH-1: COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5 et « COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test » (CA/CTM). Ces tests utilisent des techniques basées sur la combinaison de la « RT-PCR » qui cible une région conservée du gène gag et de la PCR utilisant la sonde Taqman. Cette sonde est une amorce de 25 à 30 nucléotides flanquée du côté 5' d'une molécule fluorescente ou « rapporteur » et du côté 3' d'un « quencher » ou désactivateur. Le désactivateur est une molécule qui, en raison de sa proximité avec le rapporteur, inhibe l'émission de la fluorescence de ce dernier. La sonde Taqman est complémentaire d'une région spécifique de l'ADN sur laquelle elle se fixe. Au cours de l'élongation, la polymérase clive la sonde et dissocie ainsi le rapporteur du quencher. Cette dissociation se traduit par l'émission de la fluorescence qui est détectée au-delà d'un seuil appelé Cycle threshold (CT). L'intensité de fluorescence est proportionnelle au produit formé (ADN). Les tests de Roche sont capables de mesurer les charges virales allant de 48 à 107 copies/ml. Ils détectent les sous types A-D, F-H et CRF01\_AE<sup>155</sup>.

- Le « RealTime HIV-1 Assay » d'Abbott est basé sur le même principe que Roche à la différence qu'il cible plutôt une région conservée du gène *pol*. Il est capable de mesurer les charges virales allant de 40 à 107 copies/ml et de détecter tous les sous types que détectent AC/CTM de Roche en plus du CRF02\_AG et des souches du groupe N et O du VIH-1. Toutefois, la version améliorée de CA/CTM de Roche appelée (CA/CTM, v2.0) est maintenant capable de détecter le groupe O du VIH-1 avec une sensibilité comparable à celle d'Abbott<sup>156</sup>.

- Le « NucliSens® EasyQ HIV-1 assay » et « CE Marked » développés par Biomerieux sont des techniques d'amplification isotherme (41° C) du gène *gag* par la méthode de « nucleic acid sequence-based Amplification » (NASBA) dont le principe est basé sur la réplication du VIH-1. Ici, une première amorce (antisens) comportant le promoteur T7 est utilisée pour faire le premier brin d'ADN à partir d'ARN. Il en résulte de cette étape la formation d'un double brin ADN/ARN dont l'ARN est digéré par la RNase H. La fixation d'une deuxième amorce (sens) sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé permet la synthèse de l'ADN double brin par la TI avec à sa partie 5' le promoteur T7 au complet. Puis, l'utilisation de T7 ARN polymérase qui reconnaît le promoteur T7 permet la synthèse de centaines de copies d'ARN<sup>155</sup>. Ce cycle permet ainsi une large amplification de l'ARN. La quantification se fait par l'utilisation de sondes comme dans les techniques précédentes. Ce test a une sensibilité de 10 à 107 copies/ml. Il permet la détection des sous types A à J du groupe M du VIH-1 en plus du CRF01\_AE et CRF02\_AG. Cependant, une étude récente de Deidre et al a montré que EasyQ de Biomerieux a une faiblesse dans la détection des sous type non B du VIH-1 notamment les formes recombinantes CRF01\_AE et CRF02\_AG<sup>157</sup>.
- La technique d'ADN branché Versant™ HIV-1 RNA 3.0 assay de Siemens est basée sur la technique d'hybridation ciblant le gène *pol*. Cette technique utilise des sondes et l'amplification de leurs signaux plutôt que l'amplification des séquences. Dans cette technique, l'ARN cible est pris en sandwich par hybridation entre une sonde de capture fixée sur une microplaque et une sonde de préamplification. Ensuite, une troisième sonde, appelée sonde d'amplification, reconnaît la sonde de préamplification sur laquelle elle se fixe en grande quantité. Chaque sonde d'amplification est marquée avec l'enzyme phosphatase alcaline qui donne un signal chimiluminescent après avoir réagi avec son substrat. La comparaison de ces

signaux avec un standard permet la quantification de l'ARN à analyser. Par ailleurs, une autre version de Versant développée récemment est basée sur l'amplification d'acides nucléiques. Cette version utilise les mêmes techniques de «rapporteur-quencher» décrites précédemment. Le test de Siemens a été validé sur des charges virales allant de 50-25000 copies/ml. Il permet la détection des sous type A à G du groupe M du VIH-1<sup>155</sup>. Tout comme le test de Biomerieux, le test de Siemens a aussi une faiblesse avec les formes recombinantes CRF01\_AE et CRF02\_AG<sup>157</sup>.

Cependant, aucune trousse n'existe spécifiquement pour la mesure de la charge virale du VIH-2 et jusqu'à présent, le diagnostic du groupe O ainsi que des formes recombinantes uniques nécessite encore l'expertise des laboratoires spécialisés.

### **1.3.3.3 Vaccination**

La diversité du VIH est un des plus grands obstacles à trouver aujourd'hui un vaccin anti VIH. Les vaccins viraux conduisent normalement à la production d'anticorps neutralisant empêchant ainsi une infection ultérieure. Dans le cas du VIH, aucun antigène n'a pu jusqu'ici générer des anticorps capables de neutraliser les très nombreuses variantes du virus en circulation. Jusqu'à ce jour, 219 essais vaccinaux contre le VIH ont été réalisés chez l'homme à travers le monde. Certains ont été complétés et d'autres sont en cours de réalisation. Trois essais sont actuellement en phase III, 16 en phase II, 17 en phase I/II et les 183 autres sont en phase I<sup>158</sup>. Quatre essais vaccinaux en phase clinique IIb et III se sont soldés par un échec parmi lesquels AIDSVAX B/E (VAX003) conduit au Thaïlande en 2006<sup>159</sup> et AIDSVAX B/B (VAX004) conduit en Amérique

du Nord et Netherland en 2005<sup>160</sup>. Le dernier essai en phase clinique III (RV144) effectué en Thaïlande en 2009 sur 16402 volontaires, a donné une efficacité de 26,4%<sup>161</sup>. Ceci peut être considéré comme un succès, car pour la première fois un vaccin montrait un taux de protection quelconque. La plupart des essais précédents ont été tout simplement un échec à cause du problème de variabilité du VIH. L'objectif de la recherche vaccinale est de promouvoir à la fois une réponse cellulaire et humorale. Ainsi, plusieurs protéines recombinantes ciblant plusieurs régions du virus pour stimuler l'une et/ou l'autre des réponses ont été utilisées comme candidat vaccin. La glycoprotéine gp120 de l'enveloppe est parmi les candidats ciblés par la recherche vaccinale. Dans cette partie du virus, la boucle V3 est particulièrement ciblée. Cette région, bien qu'elle soit la partie la plus exposée de l'enveloppe, est aussi la partie la plus variable du virus. Ceci fait que les anticorps produits contre cette région n'arrivent à neutraliser qu'un nombre très limité de variantes virales. Plusieurs autres stratégies ciblant d'autres régions du virus comme Nef, Tat et Rev sont en œuvre<sup>162</sup>. Cependant, si la variabilité se limitait aux sous types, la tâche serait encore plus facile et la production de plusieurs vaccins contre les différents sous-types serait possible.

Toutefois, les progrès sont en cours avec la découverte récente d'anticorps neutralisants à large spectre. En 2007, Yuxing et al ont découvert dans le sérum de 32 patients VIH-1 positifs, des anticorps à large spectre capables de neutraliser l'enveloppe virale<sup>163</sup>. Les mêmes auteurs ont observé que l'anticorps se fixe sur le site de fixation de gp120 au récepteur CD4. Ceci montre qu'il est possible de trouver des anticorps doués de telles propriétés après plusieurs tentatives échouées. Ainsi, cette observation a suscité beaucoup d'espoir pour un candidat vaccin contre le VIH-1. Sachant l'implication du site de fixation de gp120 au CD4 dans la production d'anticorps

à large spectre, une des premières études a caractérisé ce site de fixation<sup>164</sup>. Par la suite, plusieurs protéines de l'enveloppe contenant cette région ont été évaluées. Au cours de ce processus, plusieurs anticorps d'efficacité variable ont été trouvés. Un de ces anticorps, appelé VRCO1, s'est montré particulièrement efficace sur 90% des souches de VIH-1 circulant<sup>165</sup>. Présentement, les recherches se poursuivent pour comprendre les mécanismes de neutralisation de cet anticorps. Quelques résultats trouvés en complexant VRCO-1 avec gp120 ont montré que celui-ci se fixe de façon similaire au CD4, mais avec une affinité plus forte que ce dernier<sup>166</sup>.

La découverte de ces anticorps à large spectre est une grande avancée dans l'immunothérapie du VIH. Ceci ravive l'espoir de trouver un vaccin dans un futur proche et de trouver enfin une solution aux désastres qu'a causée le SIDA.

#### **1.4 Histoire naturelle de la maladie SIDA**

L'infection par le VIH évolue en plusieurs phases tout au long de la progression vers le stade SIDA. En général, trois grands stades sont décrits: la primo-infection, la phase d'infection chronique ou de latence et la phase symptomatique ou SIDA. Dans tous les cas, la multiplication virale se poursuit continuellement tout au long de l'évolution de la maladie.

##### **1.4.1 Primo-infection.**

La primo-infection traduit le premier contact du patient avec le virus. Elle peut être subdivisée en plusieurs étapes. D'abord, la période dite éclipse est située entre l'infection et avant la détection de l'ARN viral dans le plasma. Ensuite, une deuxième étape dite phase aiguë, s'étend de la détection de l'ARN viral dans le plasma jusqu'à la formation d'anticorps spécifiques trois à

quatre semaines après l'infection<sup>167</sup>. Cette étape est suivie d'une augmentation de la charge virale qui atteint son pic après la quatrième semaine, puis vers le troisième mois, commence à décroître et à se stabiliser à un niveau appelé « *setpoint* »<sup>168</sup>. La primo-infection est surtout caractérisée par des niveaux très élevés de virus et une diminution rapide des lymphocytes T CD4<sup>167</sup>. L'infection des patients se fait généralement par voie sexuelle et plusieurs études ont montré qu'une infection productive peut résulter d'un seul virus infectueux<sup>169, 170</sup>. Le virus transmis se réplique d'abord localement dans les muqueuses vaginale ou rectale. Les premières cellules à être infectées dans les muqueuses sont les lymphocytes T exprimant les récepteurs CD4 et CCR5<sup>171</sup>. Ainsi, les corécepteurs CCR5 sont en général utilisés pour initier l'infection. Au cours de la progression de la maladie, des espèces virales utilisant le corécepteur CXCR4 peuvent être observées<sup>172</sup>. Déjà à ce stade précoce, l'activation de l'immunité innée contribue au recrutement d'autres types de cellules comme les cellules de Langerhans à forte expression de CD4 et CCR5<sup>173</sup> et les macrophages qui sont à leur tour infectés par le virus. Ces cellules infectées vont migrer via le système lymphatique vers les ganglions. Dans ce compartiment immunologique, les cellules dendritiques (DC) vont lier le virus via la lectine de type C récepteur (CLR) DC-SIGN<sup>174</sup>. Ces cellules dendritiques, à cause de leur grande mobilité et leur rôle de présentation d'antigène, vont jouer un rôle prépondérant dans la dissémination de l'infection. Ainsi, ces cellules vont entraîner une large diffusion du virus dans les tissus lymphoïdes secondaires particulièrement au niveau du « *Gut associated lymphoid tissue* » (GALT) situé dans la muqueuse intestinale où est présent un nombre très élevé de cellules T exprimant les CD4 et CCR5<sup>175</sup>.

Plusieurs sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont présents dans les muqueuses. En effet, il y a deux grands types de lymphocytes: les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires. Les lymphocytes naïfs de phénotype CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> se caractérisent par l'absence de contact avec l'antigène contrairement aux lymphocytes mémoire qui ont déjà rencontré les antigènes. Les lymphocytes mémoires peuvent se diviser en deux sous populations, mémoire central (MC) et mémoire effecteurs (ME). Les MC sont de phénotype CD4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Ils résident dans les lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques, amygdale, rate, follicules lymphoïdes et plaque de Peyer grâce aux molécules d'adhésions comme CCR7 et L-sélectine (CD62L)<sup>176</sup>. Le récepteur CCR7 a pour ligand CCL19 et CCL21 tandis que CD62L se lie aux ligands GlyCAM1 (Glycolysation dependent cell adhesion molecule 1), CD34 et MAdCAM1 (mucosal addressin cell adhesion associated molecule 1) présents à la surface des cellules endothéliales des muqueuses. Les ME ont un phénotype CD4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>. A cause de la perte des molécules d'adhésions CCR7 et CD62, ces cellules sont capables de quitter les lymphoïdes secondaires pour aller siéger dans les muqueuses vaginales et rectales ainsi que dans le tractus gastro-intestinal et expriment les molécules d'activation comme le CXCR3 et le CCR5<sup>177</sup>. L'expression de ces molécules d'activation et leur localisation dans les muqueuses (rectales et génitales) qui sont les portes d'entrée du VIH, font que ces lymphocytes mémoires effecteurs sont les premiers lymphocytes infectés par le VIH.

Par ailleurs, une autre molécule d'adhésion semble importante pour l'infection du VIH. Il s'agit d'un récepteur de chimiokines CCR6 largement impliqué dans la migration des cellules vers la plaque de Peyer au niveau de l'intestin grêle. Très récemment, Monteiro et al ont montré que les

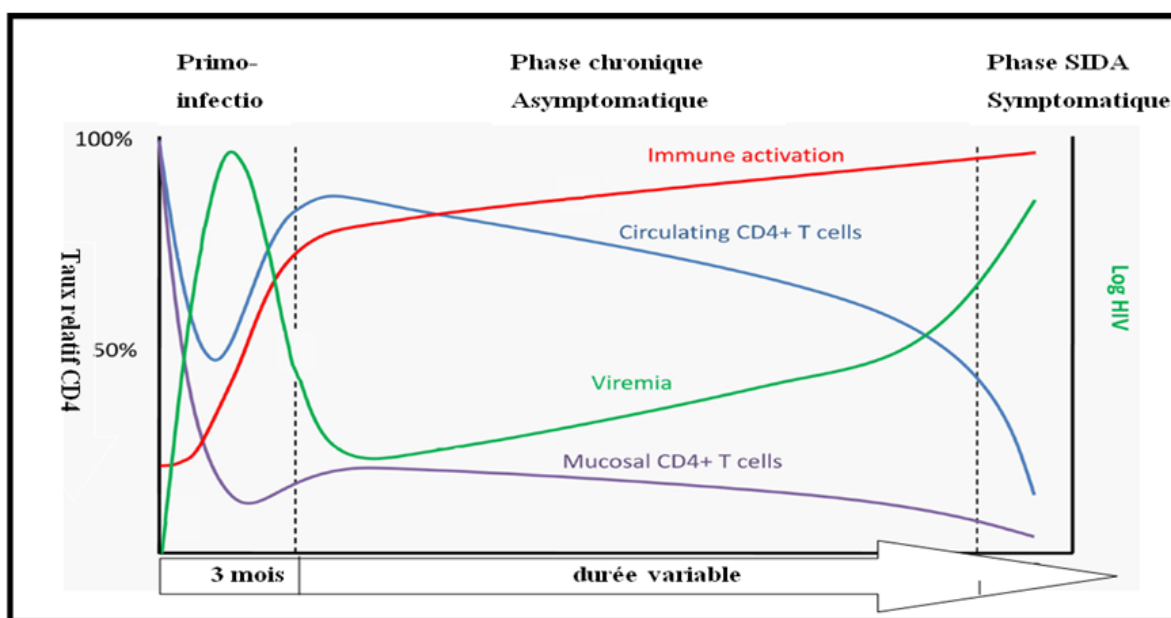
lymphocytes T mémoires exprimant CCR6 (phénotype CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>) étaient spécifiquement permissifs au VIH-1. Dans cette étude les auteurs ont comparé les différentes populations de lymphocyte T CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>β(7)<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>β<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>β<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>β<sup>+</sup>. Les résultats ont montré que les populations exprimant le CCR6<sup>+</sup> étaient largement permissives à l'infection par le VIH-1. Ceci montre que le CCR6 et non β (7) est un marqueur discriminant favorable à la réplication du VIH<sup>178</sup>.

Pendant la primo-infection, environ 60% des lymphocytes CD4<sup>+</sup> mémoire sont infectés et la majorité de ces cellules disparaissent en quelques jours<sup>179</sup> (figure 17)<sup>180</sup>. D'ailleurs, une étude chez le singe a montré que la phase aiguë de l'infection par SIV/VIH est accompagnée d'une forte déplétion de lymphocytes mémoires dans les muqueuses<sup>181</sup>. Les pertes de cellules T mémoire sont irréversibles et entraîne des dommages immunologiques surtout dans le tractus gastro-intestinal conduisant à des ruptures de barrière au niveau des muqueuses<sup>179</sup>. Malgré l'acharnement du système immunitaire, il ne parviendra pas à éliminer l'infection. Le virus se multiplie activement et atteint son pic vers 1 mois d'infection<sup>180</sup>. À ce stade, se constituent les réservoirs viraux. Ces réservoirs sont constitués en majorité de lymphocytes mémoires, mais aussi plusieurs autres lignées cellulaires comme les CD8<sup>+</sup>, les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B, et les cellules NK peuvent contribuer à la persistance virale<sup>182</sup>. Dans les réservoirs viraux, le virus persiste et pourrait se répliquer à bas bruit<sup>183</sup>. Toutefois, les études sont controversées quant à la possibilité de réplication du virus dans les réservoirs. En effet, les réservoirs sont constitués de 80% de CD4 mémoire. Ces cellules sont au stade G0, et il est connu que dans ce cas, certains facteurs de transcription comme « *nuclear factor kappa B* »



(NF- $\kappa$ B), « *nuclear factor of T-cells* » (NFAT) et le « *Positive Elongation Factor b* » (p-TEFb) sont inhibés, empêchant ainsi la production d'ARNm<sup>184</sup>.

Très souvent asymptomatique, la primo-infection peut montrer des symptômes discrets et souvent confondus à un syndrome grippal ou mononucléosique. Ces symptômes sont caractérisés par la présence de fièvre, de maux de tête, de maux de gorge, de douleurs musculaires, d'adénopathies et parfois d'une atteinte neurologique. Après le troisième mois de l'infection, la charge virale reste relativement stable autour du « *setpoint* », et alors s'installe une chronicité pour une durée plus ou moins longue selon le patient.



**Figure 17.** Stades d'infection par le VIH et évolution de la virémie et des T-CD4<sup>+</sup>. CD4 exprimé en taux relatif (100% correspond à la valeur normale). Adapté de: Mogensen et al. *Retrovirology* 2010<sup>180139</sup>. Avec l'autorisation de BioMed Central Publisher.

### 1.4.2 Phase d'infection chronique

Pendant cette phase, l'organisme active la machinerie immunologique. Le VIH-1 est largement disséminé dans les ganglions lymphatiques et la rate qui deviennent les sites de réplication du virus et de sa présentation aux cellules compétentes pour une éventuelle élimination. Au début de cette phase, le système immunitaire arrive à diminuer la virémie grâce à la réponse spécifique initiale des cellules lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>185, 186</sup>, qui éliminent la majorité des ME et MC. Cependant, cette réponse n'est pas complète et n'arrive pas à éliminer l'infection. Ceci est dû à un échappement du virus au système immunitaire à cause de sa capacité à générer des mutants. En revanche, le système de production des lymphocytes arrive à compenser plus ou moins cette perte par l'intermédiaire des lymphocytes naïfs ainsi que les MC qui n'expriment pas encore de CCR5. Ce pool constituant ainsi le potentiel de régénération des populations de lymphocytes reste relativement intact<sup>187</sup>. Ceci permet d'établir un état d'équilibre apparent entre le renouvellement et la destruction des T4. En revanche, le virus continue à stimuler ces lymphocytes qui expriment CCR5 et trouve ainsi de nouvelles cibles d'infection tout en s'assurant l'approvisionnement en cellules cibles. Toutefois, à un moment donné, s'installe la période dite de latence. Cette période est de durée variable selon les personnes infectées. Normalement, la période de latence dure entre 7 à 8 ans avant que les CD4 chutent à un niveau <200<sup>188</sup>. Par contre, la période de latence peut être réduite de 2 à 3 ans ou moins chez les patients appelés progressseurs rapides qui forment une minorité des sujets infectés par le VIH. A l'autre extrême, la période de latence peut s'étendre sur une très longue période de temps et chez certains patients la multiplication virale peut même être totalement contrôlée sans traitement pendant près de 20-25 ans dans certains cas<sup>189</sup>, avec un nombre de CD4 normal<sup>188</sup>. Ces patients

représentent 0.5% de l'ensemble des patients vivants avec le VIH et sont nommés les contrôleurs du VIH ou progresseurs lents (PL)<sup>190</sup>.

La phase d'infection chronique est surtout caractérisée par une activation permanente du système immunitaire<sup>191</sup>. Cette activation en association avec une réplication virale constante, entraînent des dommages immunologiques de plus en plus profonds surtout dans le tissu lymphoïde du tractus gastro-intestinal. Cette situation permet la translocation dans la circulation sanguine de plusieurs microbes tels que mesurés par leurs Lipopolysaccharides (LPS)<sup>192</sup>, composant essentiel de la paroi des bactéries Gram négatif, le dosage des endotoxines ou encore la détection de l'ADN ribosomal 16s bactérien<sup>193, 194</sup>. La translocation des produits bactériens entraîne une stimulation constante des cellules immunitaire et crée un état d'activation chronique du système immunitaire. Cette activation peut être mesurée par plusieurs marqueurs tels que HLA-DR et CD38<sup>195</sup> ou encore, le dosage de CRP, Ki67, IL-6 et CD14 soluble (sCD14)<sup>196</sup>. Il est proposé que cet état inflammatoire contribue au phénomène de vieillissement accéléré observé chez les sujets VIH+ avec une augmentation des maladies cardio-vasculaires, de l'ostéoporose et de divers troubles métaboliques.

### **1.4.3 Phase symptomatique et le Sida**

Au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, le système immunitaire est largement endommagé, la réplication virale augmente d'intensité et la majorité des cellules CD4+ est détruite. Cette perte de la fonctionnalité du système immunitaire rend les individus VIH+ susceptibles à diverses infections virales et fongiques comme les infections herpétiques et les

candidoses<sup>197</sup>. Quand le taux de cellules CD4+ devient inférieur à 200 cellules/mm<sup>3</sup>, les maladies opportunistes de toute origine ainsi que les cancers font leur apparition. Les fameuses maladies comme la pneumonie à *Pneumocystis* et le sarcome de Kaposi qui ont été les sonnettes d'alarme de la découverte du SIDA sont alors observées à ce stade. D'autres maladies comme la toxoplasmose, la cryptococcose, la tuberculose, les lymphomes, les infections à cytomégalovirus ainsi que des atteintes neurologiques sont aussi observées<sup>197</sup>.

### **1.5 Traitement antirétroviral et résistance**

Les principales cibles des antiviraux sont généralement des enzymes virales du cycle de la réplication, lesquelles sont différentes selon les virus et impliquent des enzymes spécifiques à chaque virus. Les exemples qui peuvent être cités sont l'ADN polymérase des virus du groupe Herpès, la transcriptase inverse et la protéase du VIH et la neuraminidase des virus grippaux. Dans le cas du VIH, une bonne connaissance de son cycle de réplication a permis de développer des antirétroviraux (ARV) ciblant plusieurs enzymes virales, mais aussi, d'autres protéines virales ainsi que des protéines de l'hôte. De nombreux progrès ont été accomplis depuis la mise sur le marché de la zidovudine (AZT) en 1987<sup>198</sup>, un inhibiteur de transcriptase inverse (INTI) et première molécule dans le traitement du VIH. Toutefois, son utilisation en monothérapie nous a fait comprendre qu'un ARV seul avait un effet limité dans le temps à cause de l'apparition de résistance. Vers les années 1990, la bithérapie a été essayée avec l'association de 2 molécules d'INTI qui montra également ces limites. La découverte d'une nouvelle classe appelée inhibiteurs de protéase (IP) en 1995 ouvre la voie à la trithérapie combinant les INTIs avec les IPs (2INTI+1IP). Au fil du temps, les connaissances se sont beaucoup améliorées et de nouvelles

classes d'ARV ciblant plusieurs étapes du cycle de réplication virale ont fait leur apparition (voire figure 3). Présentement, nous avons un large arsenal thérapeutique composé de 25 molécules approuvées appartenant à six grandes classes différentes d'antirétroviraux (tableau 1). La trithérapie a montré sans doute son efficacité par la réduction de la morbidité et de la mortalité liée au VIH. Toutefois, son efficacité est mise en épreuve par l'émergence de virus résistant en dépit de multiples molécules fournies à l'arsenal thérapeutique.

### **1.5.1 Les antirétroviraux**

#### **1.5.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse**

Les INTIs constituent la première classe d'antirétroviraux mise sur le marché. La première molécule identifiée fut l'AZT. Depuis lors, la recherche a permis d'élaborer sept autres molécules (tableau 1) approuvées par l'agence canadienne de médicament et de technologie de la santé (ACMTS ou CADTH en anglais) et le Food and Drug Administration (FDA) aux É.-U.

Les INTIs sont des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques composés d'une base purique ou pyrimidique liée à un cycle désoxyribose modifié. Les INTIs sont caractérisés par l'absence du groupement OH en position 3' que contiennent normalement les nucléosides naturels. Ce groupement OH est nécessaire à leur incorporation dans l'ADN naissant. À la différence des analogues nucléosidiques, les analogues nucléotidiques, dont le seul représentant est le ténofovir (TDF) ont une structure acyclique monophosphorylée.

Sous-classes	Noms génériques	Abréviations	Noms Commerciaux
<b>Inhibiteurs Nucléosidiques et Nucléotidique de la Transcriptase Inverse (INTI)</b>			
nucléosidiques	Zidovudine	AZT	Retrovir
	Stavudine	D4T	Zerit
	Zalcitabine	ddC	Hivid
	didanosine	ddI	Videx
	Abacavir	ABC	Ziagen
	Emtricitabine	FTC	Emtriva
	Lamivudine	3TC	Epivir
nucléotidique	Ténofovir	TDF	Viread
<b>Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI)</b>			
Première génération	Efavirenz	EFV	Sustiva
	Nevirapine	NVP	Viramune
	Delavirdine	DLV	Rescriptor
Deuxième génération	Etravirine	ETR	Intelence
	Rilpivirine	TMC 278	Edurant
<b>Inhibiteurs de protéase (IP)</b>			
Première génération	Amprenavir	APV	Agenerase
	Fosamprenavir	FVP	Telvir
	Indinavir	IDV	Crixivan
	Lopinavir	LPV	Kelatra
	Nelfinavir	NFV	Viracept
	Ritonavir	RTV	Norvir
	Saquinavir	SQV	Invirase
	Atazanavir	ATZ	Reyataz
Deuxième génération	Darunavir	DRV	Prezista
	Tipranavir	TPV	Aptivus
<b>Inhibiteurs d'intégrase (IIN)</b>			
	Raltégravir	RGV, RAL	Isentress
	Elvitégravir	EVG	-
	Dolutégravir	DGV	-
<b>Inhibiteurs d'entrée (IE)</b>			
Anti-CD4	TNX-355	-	-
Anti-CCR5	Maraviroc	MVC	Selzentry ou Celsentri
	Vicriviroc	VCV	-
	PRO-140	-	-
Inhibiteur de Fusion (Anti-gp41)	Enfuvirtide	T-20, ENF	Fuzeon
<b>Inhibiteur de maturation (IM)</b>			
	Bivirimat	-	-

**Tableau.1:** Les classes d'antirétroviraux et leurs molécules.- montre les molécules en essai.

Les INTIs sont des promédicaments ou prodrugs qui doivent d'abord être transformés à l'intérieur de la cellule pour devenir actifs. Cette transformation consiste à une triple phosphorylation par des kinases cellulaires, ce qui conduit aux INTI-triphosphate qui seront des mauvais substrats pour la synthèse d'ADN viral. Une fois incorporés dans l'ADN viral, ces composés empêchent toute progression de la synthèse. Ils sont de ce fait appelés terminateurs de chaîne. De plus, la TI n'a pas de système d'identification d'erreurs, de correction et d'élimination de nucléotides incorrects, ce qui fait le succès de ces molécules dans le traitement du VIH. Dans cette classe, d'autres nouvelles molécules sont à l'étude notamment la racivir, amdoxovir, apricitabine et elvucitabine.

#### **1.5.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse**

Les INNTI sont une classe d'antirétroviraux qui cible directement l'enzyme de rétrotranscription ou transcriptase inverse (TI). Ils ont une grande affinité pour une partie hydrophobe spécifique de la TI. En s'approchant vers cette partie, il y a création d'une pochette hydrophobe au niveau de la TI dans laquelle ces molécules vont se loger. Cette poche étant proche du site actif de l'enzyme, les INNTI, en s'y fixant, bloquent la mobilité du domaine catalytique de la TI et empêchent ainsi la réaction de polymérisation de l'ADN. Contrairement aux INTIs, les INNTIs n'ont pas besoin d'être activés. Cette classe est représentée par cinq molécules (tableau 1) approuvées par l'ACMTS et la FDA. La rilpivirine (TMC-278), une nouvelle molécule appartenant à cette classe vient d'être approuvée par la FDA. De nouvelles générations de molécules de cette classe sont également en développement.

### 1.5.1.3 Les inhibiteurs de protéase

Les inhibiteurs de protéase empêchent le fonctionnement de la protéase virale. La protéase est formée de deux sous unités qui s'associent et forment le site catalytique. Ainsi, la dimérisation est un processus incontournable pour l'activité de cette enzyme. La protéase est indispensable pour l'assemblage et la production des particules virales infectieuses: elle découpe les précurseurs polyprotéiques des protéines de structure et des enzymes de la réplication du virus. Ainsi, les IP agissent comme des faux substrats de l'enzyme. Ils ont une forte affinité avec le site actif de l'enzyme. En se fixant sur le site actif, les IP bloquent le fonctionnement de l'enzyme et de ce fait, empêchent la production des protéines matures et fonctionnelles du virus. Plusieurs molécules appartenant à cette classe sont aujourd'hui utilisées en thérapie et occupent une place importante. À ce jour, dix IP sont approuvés par l'ACMTS et la FDA souvent classés en premières et deuxièmes générations (tableau 1). La première génération, composée de ritonavir, nelfinavir, lopinavir, amprenavir, fosamprenavir, indinavir et saquinavir sont de nature peptidique mimant le substrat naturel. Elles possèdent une seule activité, celle d'inhiber le site actif de l'enzyme. L'atazanavir se trouve en position intermédiaire. C'est un azapeptide qui agit de la même façon que les molécules de la première génération. Par contre, les nouvelles générations comme darunavir et tipranavir sont non peptidiques. Ces molécules ont l'avantage d'être plus flexibles et peuvent adapter leurs interactions en fonction des changements de conformations de la protéase induits souvent par les mutations. Ces molécules possèdent aussi une double activité. En plus d'inhiber le site actif, elles bloquent la dimérisation de l'enzyme nécessaire à la formation de sa forme active<sup>199</sup>. Pour cette raison, elles sont actives sur plusieurs virus résistants aux molécules de la première génération.



#### 1.5.1.4 Les inhibiteurs d'intégrase

Les inhibiteurs d'intégrase appartiennent à une classe d'antirétroviraux récemment introduite en thérapie. Actuellement, seul le raltégravir (RAL) est approuvé par ACMTS et la FDA. L'elvitégravir (EVG), ainsi que le dolutégravir sont en essais cliniques de phase III. L'intégration de l'ADN du VIH à celle de la cellule se déroule en plusieurs étapes (voir section intégration). Théoriquement, toutes ces étapes peuvent être ciblées par les inhibiteurs d'intégrase aboutissant à une inhibition de la réplication virale<sup>200</sup>. Par contre, toutes les molécules utilisées actuellement ou en essai clinique ont pour mécanisme d'action l'inhibition de l'étape de transfert de brin assurée par l'intégrase. Plusieurs études ont montré que ces molécules inhibent efficacement le transfert de brin à des concentrations de l'ordre de nano molaire<sup>201, 202</sup>.

#### 1.5.1.5 Les inhibiteurs de CCR5

Les inhibiteurs de CCR5 ciblent essentiellement les corécepteurs CCR5 au niveau de la cellule. Cette classe contient deux molécules, dont le maraviroc, déjà approuvé et utilisé en clinique, et le vicriviroc dont le développement clinique est incertain. Actuellement une autre molécule appelée TNX-355 ciblant le récepteur CD4 est à l'étude, ainsi que des anticorps monoclonaux contre le CCR5 comme PRO-140<sup>203</sup>.

La boucle V3 et la deuxième boucle N terminal de gp120 interagissent avec le CCR5 pour l'entrée du virus. Ces deux interactions se succèdent après un changement de conformation au niveau du CCR5. Ainsi, les inhibiteurs de CCR5 sont de petites molécules qui se fixent dans une poche transmembranaire de CCR5<sup>204</sup> et empêchent le changement de conformation. De ce fait,

ces molécules bloquent l'interaction de gp120 avec CCR5 et inhibent l'entrée du virus dans la cellule. Cependant, l'inconvénient de ces molécules est qu'elles ne sont actives que sur les virus à tropisme R5. De ce fait, l'utilisation de ces molécules demande préalablement un test de tropisme.

#### **1.5.1.6 Les inhibiteurs de fusion**

Les inhibiteurs de fusion sont représentés par une seule molécule, dont le seul représentant est l'enfuvirtide, un peptide composé de 36 acides aminés mimant la région HR2 de la gp41. En se fixant sur la région HR1, l'enfuvirtide empêche l'interaction de HR2 avec HR1 bloquant ainsi la fusion des membranes cellulaires et virales<sup>205</sup>.

#### **1.5.1.7 Les inhibiteurs de maturation**

Une nouvelle classe, appelée inhibiteur de maturation est aussi en développement. Ces molécules agissent à un stade tardif de la production virale. Les inhibiteurs de maturation inhibent le clivage du précurseur gag au niveau de la jonction de la protéine de capsid (CA) et la protéine SP1 (p24/p2). Ce clivage est indispensable à la maturation des protéines virales et à l'assemblage des particules virales. La seule molécule de cette classe est le biverimat qui se fixe sur pr55gag et empêche le clivage de la protéine. Ceci entraîne la production de virions immatures et non infectieux. Très récemment, une étude a montré une bonne efficacité d'inhibition de biverimat<sup>206</sup>. Toutefois, la présence de polymorphismes naturels dans le p2 qui diminue considérablement son activité pourrait constituer un obstacle à son développement<sup>207</sup>.

### **1.5.2 Résistance aux traitements**

Le traitement antirétroviral (ARV) idéal doit venir à bout de la réplication virale. À défaut de quoi, les erreurs de la RT, les recombinaisons génétiques ainsi que la pression de sélection des médicaments contribuent à l'émergence de nouvelles variantes virales. Ainsi, il en résulte un mélange de populations virales en équilibre instable et génétiquement différent, à partir duquel vont émerger les variantes antigéniques et les mutants résistants aux antirétroviraux. La résistance virale est définie comme la capacité d'un virus à se multiplier en présence d'un traitement antirétroviral. Elle est la conséquence de la présence d'une ou de l'accumulation de mutations spécifiques sur les gènes du VIH qui codent pour la TI, la PR et d'autres enzymes ou protéines du virus ciblées par les traitements. Ces mutations entraînent une modification structurelle ou fonctionnelle de ces protéines. Les ARV ne sont pas directement responsables de la résistance, ils contribuent surtout à la sélection de mutants résistants.

#### **1.5.2.1 Mutations de résistance**

Au cours de la réplication du virus, plusieurs mutations se produisent dans le génome pouvant résulter en un échec thérapeutique. Ces mutations sont des changements d'acide aminé dans le gène du virus comparativement au type sauvage pris comme référence. Elles sont nommées en indiquant la position de l'acide aminé précédée de la lettre correspondant au type sauvage et suivi de la lettre de l'acide aminé qui a pris la place. Par exemple pour la mutation M184V, la méthionine (M) est changée pour la valine (V) en position 184.

Il existe deux grands types de mutations: les mutations synonyme et non synonyme. Rappelons que les acides aminés sont codés par des triplets de nucléotides appelés codon. Il est possible que plus d'un codon code pour un même acide aminé. Par exemple, les codons UCU, UCC, UCA, UCG, AGU et AGC codent pour la seule sérine. Ainsi, on parle de mutations synonymes quand un changement au niveau des nucléotides n'entraînant aucun changement d'acide aminé. Pour la sérine par exemple, un changement de U terminal dans UCU en G dans UCG correspond encore à la sérine. De ce fait, elles sont aussi appelées mutations silencieuses. Au contraire, les mutations non synonymes se caractérisent par un changement d'acide aminé suite à un changement au niveau des nucléotides. Par exemple, le codon UGU correspond à la cystéine. Un changement de son U terminal (UGU) par un G (UGG) codera pour le tryptophane. Elles sont aussi appelées mutations non silencieuses. Toutes les mutations ne sont pas associées à une résistance aux traitements. Certaines mutations situées sur les gènes qui codent pour les protéines ciblées par les traitements vont avoir plus d'impact sur la résistance que celles situées en dehors de ces gènes. D'autres mutations sont observées chez des souches comparées à une référence sans être forcément associées à une résistance. Dans ce cas on parle de polymorphisme.

Les mutations impliquées dans la résistance sont de deux types, majeurs et accessoires. Les mutations majeures sont celles qui confèrent une résistance phénotypique. Les mutations accessoires quant à elle, augmentent la résistance en présence des mutations majeures. Il faut aussi noter que certaines mutations sont responsables de résistance croisée. Ces mutations entraînent alors la résistance à toutes les molécules de la même classe antirétrovirale. L'ensemble de ces mutations est regroupé en profil de mutation. Ces profils comportent une ou plusieurs mutations associées à la résistance à chacune des molécules d'ARV.

## 1.5.2.2 Résistance aux différentes classes d'ARV

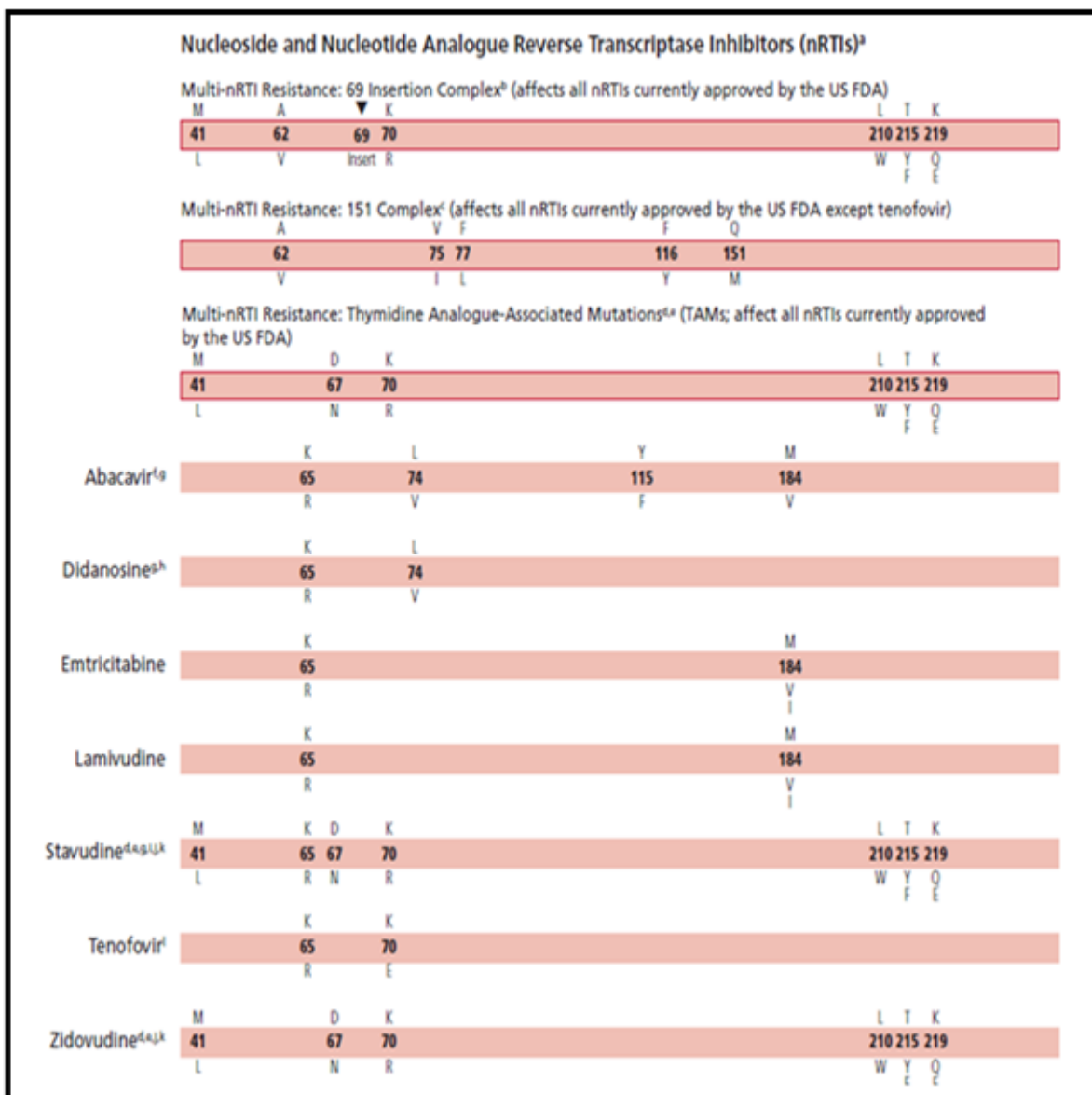
### 1.5.2.2.1 Résistance aux INTIs

Les INTIs sont des terminateurs de chaîne. Ces faux substrats, une fois incorporés dans la TI, vont bloquer la synthèse d'ADN viral, par absence de groupement OH en 3'. Des mutations au niveau de la TI vont entraîner deux grands mécanismes de résistance aux INTIs: le mécanisme de diminution d'incorporation de l'inhibiteur ou « *discrimination* » et l'excision des INTIs déjà incorporé<sup>208</sup>. Dans ces deux cas, l'inhibiteur n'est plus efficace et la synthèse de l'ADN viral se poursuit, permettant la répllication du virus.

Le mécanisme de discrimination est basé sur une diminution de l'efficacité d'incorporation des INTIs. Cependant, l'efficacité d'incorporation est liée à deux constantes majeures. La constante de la liaison phosphodiester ( $k_{pol}$ ) et la constante d'équilibre ( $k_{dNTP}$ ) de fixation-dissociation du dNTP sur la TI<sup>209</sup>. La formule de l'efficacité est ainsi donnée par le rapport  $k_{pol}/k_{dNTP}$ . À partir de ces constantes, la TI peut donc faire la différence entre les nucléotides naturels et les analogues. Dans les conditions normales, les analogues ont une bonne efficacité d'incorporation. Par contre, l'apparition de certaines mutations dans la TI entraîne une augmentation de l'énergie de fixation-dissociation ( $k_{dNTP}$ ). Comme nous voyons dans la formule, l'efficacité est inversement proportionnelle à  $k_{dNTP}$ . Ainsi, toute augmentation de cette constante se traduit par une diminution de l'efficacité. Ces mutations vont donc favoriser l'incorporation des nucléotides naturels au détriment des analogues et entraînent par conséquent une résistance aux INTIs. Les mutations les plus souvent impliquées dans ce mécanisme sont la M184V et le complexe de mutation Q151M<sup>208</sup>.

- La M184V, qui correspond à un changement de la méthionine (M) par la valine (V), entraîne un haut niveau de résistance à la lamivudine (3TC). La méthionine en position 184 fait partie des acides aminés du motif YMDD du site catalytique de la TI. Ce motif est hautement conservé chez les rétrovirus<sup>210, 211</sup>. Le changement de la méthionine par la valine entraîne un mauvais positionnement de 3TC-TP dans le site catalytique<sup>210</sup> et entraîne ainsi une augmentation de kdNTP se traduisant par une diminution de l'affinité pour l'inhibiteur<sup>212</sup> et une perte d'incorporation. La mutation M184V apparaît rapidement en cas d'échec virologique au 3TC en passant par une mutation intermédiaire M184I<sup>211</sup> et donne aussi la résistance à d'autres INTIs (figure 18)<sup>213</sup>.
- Le complexe de mutation Q151M passe par le même mécanisme que la M184V. Le complexe de mutation Q151M est composé d'un groupe de mutations dont A62V, V75I, F77L et F116Y dans lequel la Q151 apparaît le premier. Ces mutations sont sélectionnées en cas d'échec aux INTI, préférentiellement le d4T et le ddI. Associé à une multirésistance à la plupart des INTIs, il a été montré que le complexe Q151M entraîne un haut niveau de résistance à l'AZT, ddI, ddC, d4T et l'ABC<sup>214</sup>.

Le deuxième mécanisme de résistance aux INTIs est l'excision des analogues déjà incorporés dans l'ADN en synthèse (figure 19)<sup>215</sup>. En effet, l'incorporation des nucléotides se fait en deux étapes essentielles impliquant deux sites au niveau de l'enzyme. Un site N, qui assure la fixation des nucléotides basés sur la complémentarité, et un deuxième site P qui assure la polymérisation des nucléotides. Les nucléotides qui se fixent bien au niveau du site N sont ensuite transloqués au niveau du site P pour une éventuelle polymérisation. Le site N joue donc un rôle crucial.



**Figure 18.** Mutations de résistance aux INTI selon « *international AIDS society* » 2011<sup>213</sup>

Un mauvais positionnement au niveau de ce site empêche la translocation des nucléotides vers le site p et par conséquent entraîne leur élimination. Cependant, un mécanisme compensatoire existe. Il s'agit d'un encombrement stérique empêchant l'excision du nucléotide mal positionné si le nucléotide suivant est trop proche du site N. L'excision est médiée par l'ATP via une

attaque nucléophile<sup>216</sup>. Ainsi, certaines mutations au niveau de la TI font en sorte que les analogues ne se positionnent pas bien dans le site N, ce qui entraîne leur excision. Les « *thymidine-associated mutations* » (TAM) ainsi que l'insertion en position 69 agissent par ce mécanisme pour induire la résistance aux INTIs.

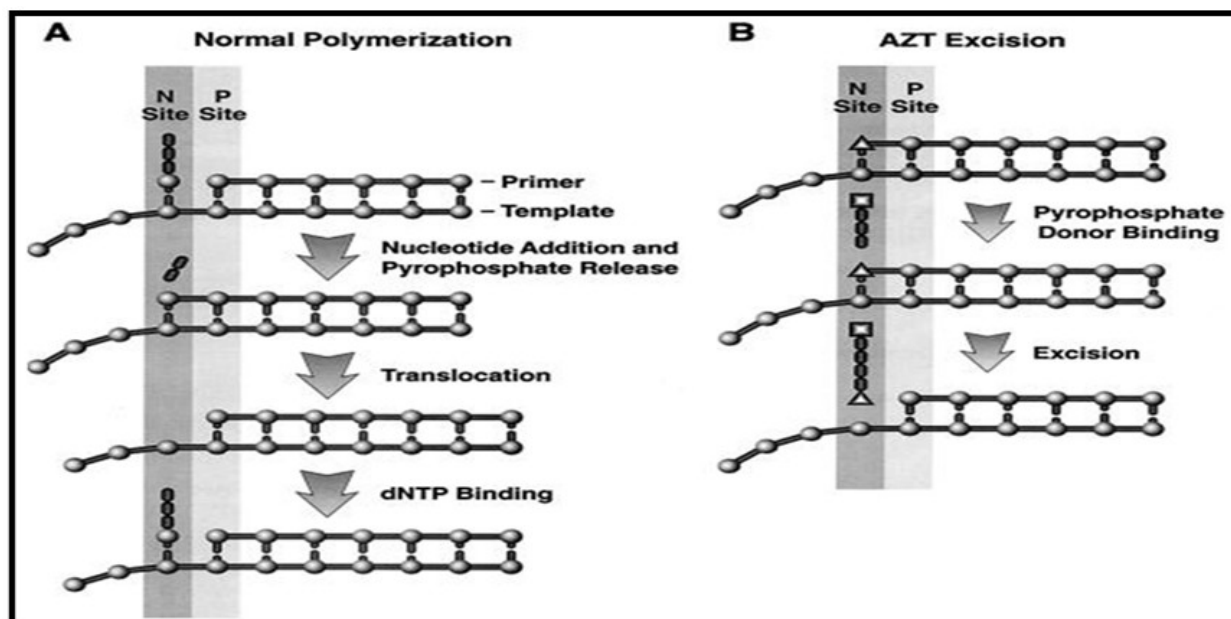
Les TAM entraînent la résistance à tous les INTIs, mais l'efficacité d'excision est variable selon les INTIs. Il a été montré que l'excision est plus efficace avec l'AZT et de façon décroissante, d4T, ddC, ABC, 3TC, ddI et TDF<sup>217</sup>, ce qui explique en partie les résistances croisées entre les INTIs. En effet, il existe deux voies TAM sélectionnées par les INTIs. La voie TAM-1 composé de mutation M41L, L210W et T215Y et la voie TAM-2 avec les mutations D67N, K70R et K219E/Q et T215F. Il a été montré que la voie TAM1 entraîne une résistance croisée *in vivo* entre ABC et TDF<sup>218, 219</sup>.

L'insertion en position 69 entraîne aussi une résistance à l'ensemble des INTIs. Elle peut utiliser les deux mécanismes: en plus de diminuer l'incorporation, elle entraîne aussi une augmentation de l'excision des INTIs déjà incorporés<sup>220</sup>.

La mutation K65R est une mutation décrite pour la première fois avec ddC qui la sélectionne *in vitro* et *in vivo*<sup>221</sup>, mais aussi avec ddI et 3TC<sup>222</sup>. Elle est aussi sélectionnée seule ou en association avec la M184V par des régimes comportant le ténofovir et/ou l'abacavir<sup>223, 224</sup>. Son mécanisme de résistance est basé sur la diminution de l'incorporation entraînant une résistance au TDF et l'ABC ainsi que le ddI, d4T, 3TC et FTC<sup>225</sup>. Cependant, cette mutation provoque une diminution de l'excision, entraînant une augmentation de la sensibilité des virus aux molécules



via le mécanisme d'excision tout comme l'AZT. La mutation K65R est rarement retrouvée en présence de TAM<sup>225, 226</sup>. En effet, en présence de TAM, la mutation K65R une fois associée va entraîner une diminution de l'excision<sup>225</sup>, rendant ainsi les virus sensibles aux molécules qui sélectionnent les mutations TAM. Cet antagonisme entre la mutation K65R et TAM peut aussi expliquer l'absence de K65R si les mutations TAM sont déjà présentes dans un régime avec ténofovir. Puisque les TAM entraînent une résistance au ténofovir, celui-ci n'a pas besoins de pression supplémentaire pour sélectionner le K65R. Enfin, cet antagonisme pourrait mener à l'hypothèse selon laquelle l'administration de l'AZT avec le ténofovir permettrait de prévenir la sélection de la mutation K65R<sup>227</sup>. Par ailleurs, il faut signaler que certaines mutations aux INTI comme la K65R et la M184V entraînent une diminution du « *fitness* » des virus qui les portent<sup>228</sup>.



**Figure 19.** Mécanisme d'excision des INTI. A) polymérisation normale et B) excision de l'ZT déjà incorporé. Tiré de Boyer et al. J Virol 2002<sup>215</sup>. Avec la permission d'American Society for Microbiology.

### 1.5.2.2.2 Résistance aux INNTIs

Rappelons que les INNTIs se fixent dans une poche hydrophobe créée par leur amerrissage sur la TI. Cette poche n'est formée qu'avec la présence des INNTIs. La formation de cette poche est rendue possible par le mouvement des résidus Y181 et Y188 de la chaîne latérale de la TI. Par ailleurs, d'autres acides aminés participent directement à la fixation des INNTIs à la TI comme les positions 100 et 106 ou indirectement comme ceux à la position 108<sup>229</sup> et 103<sup>230</sup>. En outre, d'autres acides aminés comme la position K101E et E138K participeraient aussi à la formation de la poche hydrophobe<sup>231, 232</sup>. Les changements au niveau de ces acides aminés peuvent affecter la bonne fixation des INNTIs dans la poche hydrophobe, entraînant une diminution de l'affinité à ces molécules et la résistance. Quatre groupes essentiels de mutations sont impliqués<sup>229</sup> à des degrés divers dans la résistance aux INNTIs. Le premier groupe est composé de Y181C et Y188C/L/H, le deuxième concerne la mutation K103N, le troisième groupe est constitué de mutations L100I, V106AM et V108I, enfin le dernier comporte les mutations K101E et E138K. D'autres mutations moins fréquentes telles que P225 ainsi M230 et P236 sont observées dans la résistance aux INNTIs et sont regroupées en un groupe à part<sup>229</sup>.

Les acides aminés en position Y181 et Y188 participent directement à la formation de la poche hydrophobe. Plusieurs études ont montré que la tyrosine en position 181 et 188 joue un rôle primordial dans la constitution de cette poche du fait de son caractère aromatique. Ainsi, la perte de cette tyrosine est impliquée à la résistance croisée aux INNTIs mais à des degrés différents. Par exemple, la mutation Y181C entraîne une forte résistance à la nevirapine<sup>232, 233</sup>. Cette mutation entraîne une réduction de la sensibilité de l'efavirenz<sup>229</sup>.

La mutation K103N ne participe pas directement à la fixation des INNTIs. Dans cette mutation, la lysine est remplacée par l'asparagine. Ce dernier a la capacité de former une liaison hydrogène directement à partir de son groupe amine avec le groupe hydroxyle de la tyrosine en position 188<sup>234</sup> ou indirectement via un pont sodium<sup>233</sup>. Dans tous les cas, cette interaction empêche la formation de la poche hydrophobe à l'approche des INNTIs entraînant une résistance croisée aux INNTIs.

Les mutations L100I et V106A/M sont très impliquées dans la résistance aux INNTIs. La mutation L100I entraîne une résistance à tous les INNTIs. Pour la mutation V106AM, elle donne la résistance à tous les INNTIs excepté l'etravirine. La sensibilité de l'etravirine malgré la mutation V106AM est liée au fait que cette molécule n'interagit pas avec cette position pour sa fixation<sup>229</sup>. Dans ce groupe, la mutation V108I ne participe pas directement à la fixation de la plupart des INNTIs. Par contre, du fait de sa proximité avec la poche, elle peut perturber indirectement la fixation des INNTIs et entraîner une réduction de la sensibilité. Toutefois, la mutation V108I ne donne pas une résistance de haut niveau comme les deux précédentes.

Le dernier groupe, composé par des mutations K101E et E138K, participe indirectement par rapport aux positions 181 et 188 à la bonne formation de la poche hydrophobe. La lysine à la position 101 forme un pont avec la glutamine de la position 138, ce qui contribue à la formation de la poche et la fixation des INNTIs. Ainsi, les mutations à ces différentes positions perturbent cette interaction et par conséquent la fixation des INNTIs. La mutation K101E/P observée à cette position conduit à une résistance à tous les INNTIs. La mutation E138K est sélectionnée *in vitro* par l'etravirine. Une étude récente d'Asachop et al sur les sous types B et non-B (C et CRF02-

AG) vient de montrer qu'indépendamment des sous type, la mutation E138K est la première à apparaître après 25 à 30 semaines de passage. L'analyse phénotypique de cette mutation à montré qu'elle entraîne une faible résistance à l'etravirine et à l'efavirenz<sup>235</sup>. Par contre, la mutation E138K n'est pas sélectionnée par l'efavirenz in vitro. Ces résultats montrent que l'etravirine a une barrière de résistance relativement élevée. Par ailleurs, la mutation E138K ne donne aucune résistance à la nevirapine, probablement à cause d'apparition d'autres mutations compensatoires<sup>229</sup>. Cependant, elle provoque une faible réduction de la sensibilité aux autres INNTIs. Ces données peuvent avoir un impact sur la façon de séquencer les différents INNTIs. Il est aussi important de mentionner ici que dans l'étude d'Asachop et al, plusieurs nouvelles mutations en dehors d'E138K telles que V90I, K101Q et V189I ont été observées sous pression d'etravirine.

Les acides aminés en position P225, M230, P236 et K238 sont localisés des deux côtés opposés de la poche hydrophobe. Les mutations observées à ces différentes positions sont impliquées à la résistance aux INNTIs selon les molécules. Toutefois, la mutation P236L qui entraîne la résistance à la delavirdine peut entraîner une hypersensibilité à certains INNTIs comme la nevirapine<sup>236</sup>. En effet, toutes les molécules n'interagissent pas avec les mêmes acides aminés pour leur fixation, ce qui explique cette différence de résistance en fonction des molécules. Ainsi, les mutations P225H et P236L entraînent uniquement la résistance respectivement à l'efavirenz et à la delavirdine. En revanche, la mutation M230L donne la résistance à tous les INNTIs ainsi que la mutation K238T avec un accent sur la nevirapine et la delavirdine. La figure 20 résume les mutations INNTIs selon la base de données « *International AIDS Society* »<sup>213</sup>

Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) <sup>a,m</sup>											
Efavirenz	L	K	K	V	V	Y	Y	G	P		
	100	101	103	106	108	181	188	190	225		
	I	P	N	M	I	C	L	S	H		
			S			I		A			
Etravirine <sup>n</sup>	V	A	L	K	V	E	V	Y	G	M	
	90	98	100	101	106	138	179	181	190	230	
	I	G	I*	E	I	A	D	C*	S	L	
			H	P*		G	F	I*	A		
						K	T	V*			
						Q					
Nevirapine	L	K	K	V	V	Y	Y	G			
	100	101	103	106	108	181	188	190			
	I	P	N	A	I	C	C	A			
			S	M		I	L	H			
Ralpivirine <sup>o</sup>	K					E	V	Y	H	F	M
	101					138	179	181	221	227	230
	E					A	L	C	Y	C	I
	P					G		I			L
						K*		V			
						Q					
						R					

**Figure 20.** Mutations de résistance aux INNTI selon « *international AIDS society* » 2011<sup>213</sup>

### 1.5.2.2.3 Les mutations au domaine de connexion RT-RNase-H

Rappelons que la TI a deux domaines majeurs impliqués dans son activité enzymatique, le domaine de polymérase et le domaine RNase-H. La jonction entre ces deux domaines constitue le domaine de connexion situé au niveau des acides aminés 293 et 560 de la TI. En clinique, les analyses sur TI par séquençage n'incluent pas ce domaine<sup>237</sup>. Les premières investigations sur cette région ont montré qu'elle est impliquée dans la résistance aux analogues de la thymidine comme l'AZT et le 3TC<sup>238, 239</sup>. En 1998, Kemp et al ont montré que la mutation G333D était incriminée dans la double résistance à l'AZT et au 3TC en association avec les TAM ou M184V. Par la suite, les études ont identifié plusieurs mutations au domaine de connexion (MDC): E312Q, G333E/D, G335D, N348I, R358K, G359S, A360I/T/V, V365I, K366R, T369I, A371V,

A376S, T377L, K390R, E399D, A400T, L469T, Q475A et Y501A, I506L, Q509L, K527N, K530R, Q547K, D549N et K558R<sup>237, 240, 241</sup>. Certaines de ces mutations sont associées à la résistance aux INTI et INNTI dans le sous-type B. Toutefois, le mécanisme réel reste non élucidé. En 2008 Zelina et al, ont investigué in vitro le mécanisme moléculaire de la mutation G333D en association avec les TAM ou M184V dans la double résistance à l'AZT et au 3TC<sup>242</sup>. Dans leur étude, ils ont observé que G335D renforce les mécanismes de résistance des TAM et M184V. D'abord, pour les virus avec les mutations G335D et M184, ils constatent une réduction de la constante  $K_{pol}$ . Considérant la formule d'efficacité:  $E=K_{pol}/k_{dNTP}$ , toute diminution de  $K_{pol}$  ou une augmentation de  $k_{dNTP}$  entraîne une baisse d'efficacité. Ainsi, G335D contribue à diminuer l'efficacité d'incorporation de 3TC en diminuant le  $K_{pol}$  et par conséquent, renforce l'effet de résistance de M184V qui augmente la constante  $k_{dNTP}$ . Pour les virus qui avaient les mutations G333D et TAMs, c'était le mécanisme d'excision qui était renforcé par G333D, augmentant la résistance causée par les TAMs à l'AZT.

Très récemment, il a été confirmé que les mutations au domaine de connexion entraînent une double résistance aux INTIs et INNTIs<sup>240</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont trouvé que les MDC entraînent une réduction de l'activité de l'Arase-H. Ainsi, l'hypothèse avancée pour le mécanisme de résistance aux INNTIs est que cette diminution d'activité de la RNase H offre plus de temps aux INNTIs de se dissocier de la TI, ce qui permet la reprise de la synthèse de l'ADN et par conséquent la résistance aux INNTIs. Par ailleurs, ils ont observé que cette réduction de l'activité de la RNase-H et la résistance aux INNTIs étaient fonction de l'affinité des INNTIs. Par exemple, les mutations D549N, Q475A et Y501A entraînent une augmentation de la résistance aux NVP et DLV, mais pas à l'EFV et l'ETR. Par ailleurs, la mutation D549N était

associée à une double résistance aux INTIs et INNTIs. Une étude récente a montré que les mutations G335D et A371V ne suffisent pas pour provoquer une résistance indépendamment des sous-types. Mais, quand ces mutations sont associées à M184V, elles conduisent à un haut niveau de résistance à l'AZT<sup>241</sup>.

#### **1.5.2.2.4 Résistance aux IP**

La protéase joue un rôle important dans l'assemblage des virus. Elle découpe les précurseurs de protéines virales afin de fournir des protéines matures pour l'assemblage. Les inhibiteurs de première génération de la protéase sont des peptidiques mimant le substrat naturel. Pour cette raison, ils possèdent une grande affinité pour le site actif dans lequel ils se fixent et inhibent la fonction de la protéase. Ainsi, les mutations au niveau de ce site actif de la protéase empêchent la bonne fixation des inhibiteurs. Ce mécanisme peut être double: soit les mutations agrandissent le site de fixation au niveau de la protéase (figure 21)<sup>243</sup>, soit les mutations influencent directement la fixation de l'inhibiteur par la disparition des liaisons auparavant utilisées par les différentes molécules. Dans les deux cas, cela se traduit par une diminution de l'affinité pour la protéase et une inefficacité des molécules inhibitrices. En général, une seule mutation n'est pas suffisante pour induire la résistance aux inhibiteurs de protéase. L'accumulation de plusieurs mutations est nécessaire pour l'apparition de la résistance. Toutefois, certaines mutations dites majeures sont importantes pour l'émergence de la résistance. C'est le cas des mutations D30N I50V, V82A, et L90M. A ces mutations s'associent d'autres mutations appelées secondaires qui appuient l'effet des mutations majeures. Les mutations majeures entraînent une résistance à l'ensemble des IP de première génération en association avec les secondaires. La résistance

croisée peut être aussi observée avec ces molécules. Ce phénomène se traduit par la présence d'une mutation généralement secondaire impliquée à la fois à la résistance à plusieurs autres molécules de la classe. Les mutations majeures peuvent être sélectionnées préférentiellement par l'une ou l'autre des molécules inhibitrices. La mutation V82A est observée en cas d'échec au ritonavir<sup>244</sup>. Pour le nelfinavir, la mutation D30N est préférentiellement sélectionnée<sup>245</sup>. La mutation L90M est sélectionnée préférentiellement par le saquinavir<sup>246, 247</sup> et la mutation I50V par l'amprenavir<sup>248</sup>. Cependant, pour d'autres inhibiteurs comme le lopinavir ou l'indinavir, la préférence semble variable. La résistance à ces deux molécules peut commencer avec l'apparition de l'une des mutations V82A, M46I, L90M ou A71V<sup>249</sup>. Les mutations majeures sont situées au niveau du site actif de l'enzyme et leurs positions sont directement impliquées dans la fixation des molécules inhibitrices. Ceci pourrait expliquer l'importance de ces mutations dans la résistance aux IPs de première génération. En revanche, les mécanismes d'action des mutations secondaires sont mal compris. Certaines positions comme I54 ou M46 sont situées dans le volet « *flap* » de la protéase et recouvre le substrat après sa liaison au site actif<sup>244</sup>. Ainsi, cela pourrait partiellement expliquer que les mutations à ces positions pourraient renforcer l'effet des mutations majeures. Le mécanisme d'autres mutations comme la L10I/V, K20R, A71V situées à distance du site reste aussi inconnu. Ces mutations pourraient agir indirectement par modification de la conformation générale du site actif<sup>250</sup> et contribuer à la résistance aux IP de première génération.

Les molécules de la nouvelle génération comme le darunavir et le tipranavir possèdent une barrière génétique élevée. Une étude effectuée sur le tipranavir a montré une réponse virologique intermédiaire après l'apparition de deux à sept mutations parmi la liste des mutations de



résistance<sup>251</sup> recensées pour cette molécule dans les positions suivantes: 10V, 13V, 20M/R/V, 33F, 35G, 36I, 43T, 46L, 54A/M/V, 58E, 69K, 74P, 82L/T, 83D et 84V<sup>252</sup>. Darunavir n'affiche une perte de la réponse virologique qu'après l'apparition de trois mutations parmi la liste des onze mutations recensées<sup>252</sup>. Toutefois, la notion de barrière doit être nuancée, car certaines molécules de la première génération partagent souvent les mêmes mutations avec les nouvelles IPs. Par exemple, le tipranavir sélectionne les mutations V82L/T et I84V qui sont responsable de la résistance croisée à d'autres IPs<sup>253</sup>. Parmi les mutations recensées avec le darunavir (V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V et L89V)<sup>252</sup>, plusieurs dont la V32I, I47L et I50V croisent avec le fosamprenavir. En revanche, il a été récemment montré qu'une protéase multi résistante avec des mutations 46L, 54V, 82T, 84V, 90M était encore sensible au darunavir. Cette étude a montré par cristallographie qu'en présence de ces mutations de multi résistance, le darunavir ne perd que deux interactions hydrophobes en position 81 et 84 (compense d'ailleurs par la position 23) et une seule interaction hydrogène en position 29. Ainsi malgré ces mutations de multirésistance, darunavir maintient son attache et reste actif sur l'enzyme<sup>254</sup>. Ceci montre également l'importance de la flexibilité que possèdent les molécules de la nouvelle génération dans leurs structures.

Ces molécules montrent quand même des mutations associées à la résistance, et situées à des positions impliquées directement ou indirectement à leurs fixations à l'enzyme. Le mécanisme réel est inconnu mais semble être double. Rappelons que ces molécules agissent à deux niveaux sur la protéase: le blocage de la dimérisation et l'inhibition de l'activité catalytique<sup>199</sup>. Ainsi, il a été récemment démontré que ces mutations de résistance sont spécifiques aux deux activités. Certaines mutations empêchent seulement le blocage de la dimérisation, tandis que d'autres

abolissent leurs actions d'inhibition sur l'activité catalytique de la protéase. Une étude très récente basée sur l'essai de transfert d'énergie de fluorescence par résonance ou « *Fluorescence Resonance Energy Transfer* » (FRET) a montré que la présence des mutations V32I, L33F, I54M et I84V abroge l'activité d'inhibition de la dimérisation du darunavir, ceci pourrait être un des mécanismes de résistance à cette molécule<sup>255</sup>. Les autres mutations empêchent plutôt son action sur l'activité catalytique. Ce mécanisme a été récemment montré aussi avec le tipranavir. Manabu et al ont trouvé que les mutations L33F et la combinaison de L33I/M36I annulent l'activité d'inhibition de la dimérisation du tipranavir<sup>256</sup>. Par contre, les mutations I54V et V82T étaient associées à une perte de l'effet d'inhibition de l'activité catalytique. Ces deux mutations n'avaient aucun effet sur l'activité d'inhibition de la dimérisation<sup>256</sup>.

Par ailleurs, il a été montré que des mutations dans le gène *gag* au niveau du site de clivage sont impliquées dans la résistance aux IPs. Toutefois, ces mutations ne sont pas prises en compte dans les études de résistance aux IPs, puisque les évaluations sont effectuées seulement sur la protéase. Plusieurs mutations (428G, 431V, 436R, 437V, 449F, 451T, 452S, 453L) ont été associées à la résistance aux IPs<sup>257</sup>. Ces observations ont été confirmées par l'étude de Nijhuis et al. Dans cette étude, les auteurs ont séquencé le génome complet des virus résistants aux IPs de 4 à 8 fois par rapport au type sauvage. Ils ont observé la présence des mutations K436E et/ou I437T/V au niveau du site de clivage NC/p1 de la polyprotéine gag. L'introduction de ces mutations dans une souche de référence HXB2 a conféré la résistance à tous les IP<sup>258</sup> à l'exception du darunavir qui n'a pas été évalué dans ce travail. En revanche, l'étude de Larrouy et al a montré très récemment que la mutation A431V aurait un impact positif sur la réponse virologique chez les patients traités avec le darunavir/ritonavir<sup>259</sup>.

Deux mécanismes ont été observés pour expliquer la résistance aux sites de clivage gag.

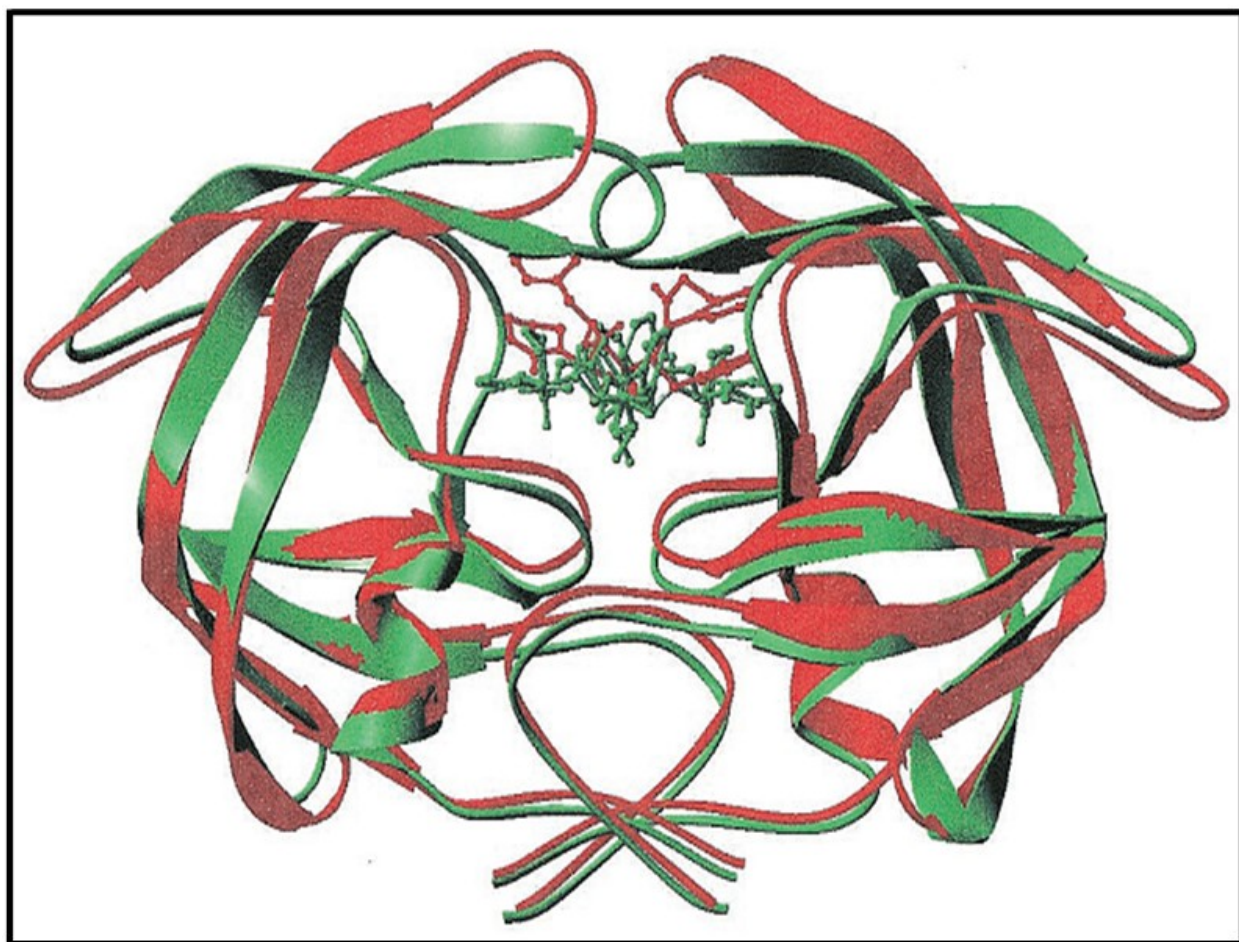
- Le premier mécanisme implique des mutations situées dans la région gag-gag/pol. Dans ce cas, les mutations entraînent un déséquilibre dans le clivage de la protéine gag/pol en faveur d'une forte production de la protéase. Ceci augmente la concentration de l'inhibiteur normalement actif sur les virus.
- Le deuxième mécanisme est observé lorsque les mutations sont situées au niveau de NC/p1, NC/TFP et TFP/p6pol. Dans ce cas, les mutations entraînent un déséquilibre dans le processus de clivage des polyprotéines en faveur d'une grande amélioration de la maturation virale<sup>258</sup>.

Par ailleurs, Malet et al ont observé des associations entre les mutations au niveau du site de clivage gag et l'apparition des mutations dans la protéase. Dans cette étude sur 98 séquences de VIH-1 de sous type B, l'apparition des mutations M46I/L, I54V et V82A/T/F était associée à la présence de la mutation A431V dans gag. Les mutations K20I/R/M et L89M/I étaient aussi associées à la présence des mutations S373Q et L449P dans gag<sup>260</sup>. Les mécanismes qui sous-tendent ces associations restent non élucidés pour le moment.

En outre, une grande étude basée sur l'analyse de 28000 isolats de patients a montré que la mutation en position 431 est observée à 13%, la position 436 à 8% et 437 à 10%<sup>258</sup>. Ces positions sont fortement associées à la résistance aux IPs. Il serait alors prudent aujourd'hui d'introduire la recherche de ces mutations dans l'évaluation de la résistance aux des IPs qui sont réservés pour la deuxième ligne de traitement dans les pays à ressources limitées. La figure 22 résume les

mutations recensées au niveau des IP selon la base de données de « *International AIDS Society* »

213



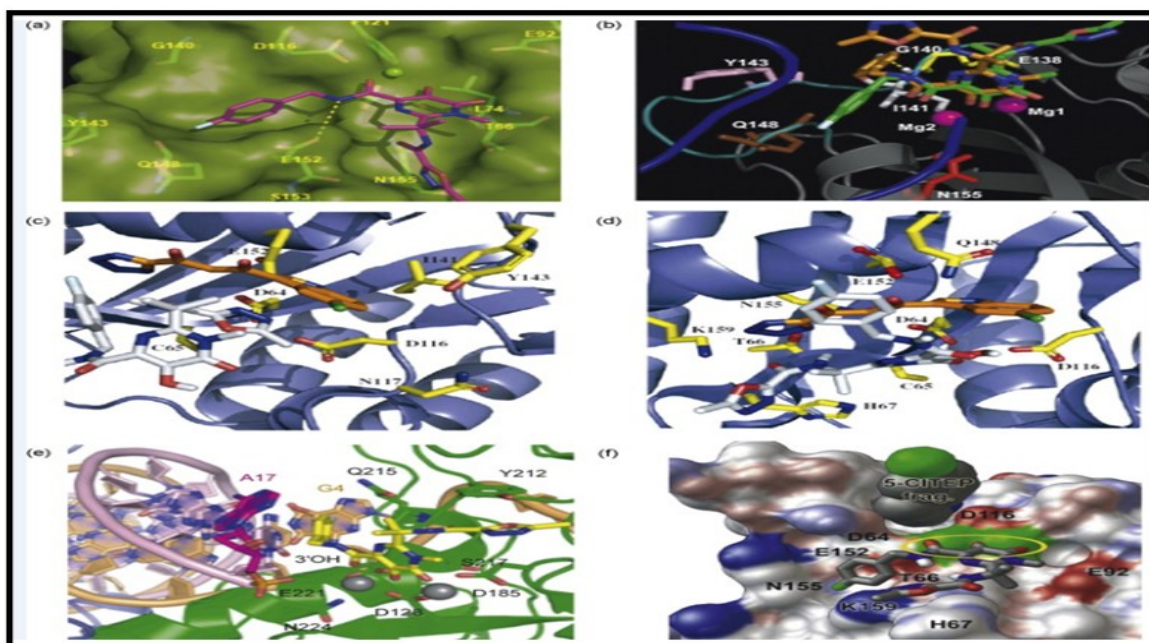
**Figure 21.** Structure de deux conformations de la protéase. En **vert protéase sensible** sans mutation avec le lopinavir et en **rouge protéase résistante** à cause des mutations qui agrandissent le site de fixation empêchant la liaison du lopinavir. Tiré de Logsdon et al. *J Virol* 2004<sup>243</sup>. Avec la permission d'American Society for Microbiology.

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS <sup>247</sup>																								
Atazanavir +/- ritonavir <sup>®</sup>	L	G	K	L	V	L	E	M	M	G	I	F	I	D	I	I	A	G	V	I	I	N	L	I
	10	16	20	24	32	33	34	36	46	48	50	53	54	60	62	64	71	73	82	84	85	88	90	93
	I	E	R	I	I	I	Q	I	I	V	L	L	L	E	V	L	V	C	A	V	V	S	M	L
	F	M			F			L			Y	V			M	V	S	T	T	F				
	V	I	T	V	V						M	T	A				L	A	I					
	C																		F					
Darunavir/ ritonavir <sup>®</sup>	V				V	L			I	I	I						T	L	I		L			
	11				32	33			47	50	54						74	76	84		89			
	I				I	F			V	V	M						P	V	V		V			
											L													
Fosamprenavir/ ritonavir <sup>®</sup>	L				V				M	I	I	I					G	L	V	I	L			
	10				32				46	47	50	54					73	76	82	84	90			
	F				I				I	V	V	L					S	V	A	V	M			
	I								L		V	M							F					
	R																		S					
	V																		T					
Indinavir/ ritonavir <sup>®</sup>	L	K	L		V				M		I						A	G	L	V	V	I	L	
	10	20	24		32	36			46		54						71	73	76	77	82	84	90	
	I	M	I		I	I			I		V						V	S	V	I	A	V	M	
	R	R							L								T	A	V	I	A			
	V																		F					
																			T					
Lopinavir/ ritonavir <sup>®</sup>	L	K	L		V	L			M	I	I	F	I				L	A	G	L	V	I	L	
	10	20	24		32	33			46	47	50	53	54				63	71	73	76	77	82	84	90
	F	M	I		I	F			I	V	V	L	V				P	V	S	V	A	V	M	
	I	R							L	A		L	A						T		F			
	R											M	T								T			
	V											S									S			
Nelfinavir <sup>™</sup>	L				D				M		M						A		V	V	I	N	L	
	10				30				36		46						71		77	82	84	88	90	
	F				N				I		I						V		I	A	V	D	M	
	I										L						T		F		S			
																			T					
																			S					
Saquinavir/ ritonavir <sup>®</sup>	L		L							G	I	I					A	G	V	V	I	L		
	10		24							48	54	62	71	73			77	82	84	90				
	I		I							V	V	V	V	S			I	A	V		M			
	R										L								F					
	V																		T					
																			S					
Tipranavir/ ritonavir <sup>®</sup>	L				L	M		K	M	I	I	Q		H	T		V	N	I	L				
	10				33	36		43	46	47	54	58		69	74		82	83	84	89				
	V				F	I		T	L	V	A	E		K	P		L	D	V	I				
						L					M			R			T			M				
						V					V									V				

**Figure 22.** Mutations de résistance aux IP selon « *international AIDS society* » 2011<sup>213</sup>. En gras les mutations majeures.

### 1.5.2.2.5 Résistance aux Inhibiteurs d'intégrase

L'intégrase est une enzyme responsable de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire<sup>261</sup>. Les inhibiteurs d'intégrase se fixent sur le site actif de l'enzyme et l'empêchent de fonctionner correctement. Actuellement les molécules utilisées en thérapie agissent sur l'étape de transfert de brin<sup>262</sup>. Il est connu que la cavité formée par les résidus D64, C65, T66, H67, E92, N120, F121 et D116 définit le site actif pour la réaction 3'processing, tandis que les résidus Q62, I141, P142, Y143, Q148, I151, E152, N155, K156 et K159 définissent la cavité de transfert de brin<sup>263</sup>. Ces mêmes résidus sont la cible des inhibiteurs d'intégrase sur lesquelles ils se fixent (figure 23)<sup>263</sup> et s'opposent au transfert de brin. Ainsi, toute mutation au niveau de ces résidus pourrait modifier l'affinité de l'enzyme pour les inhibiteurs et entraver leur bonne fixation, empêchant donc leur fonction d'inhibition.



**Figure 23.** Différentes conformations du raltegravir et les résidus impliqués dans son interaction avec l'intégrase. Tiré de Mouscadet et al. *Drug Resist Updat* 2010<sup>263</sup>. Avec la permission d'Elsevier Limited.

La plupart des mutations rapportées par les études se situent dans le site de fixation des inhibiteurs. Aujourd'hui, 64 mutations sont rapportées comme induisant la résistance aux inhibiteurs d'intégrase<sup>262</sup>. Pour le raltégravir, seule molécule approuvée de cette classe ainsi que l'elvitégravir en phase III, quarante mutations de résistance ont été déjà observées<sup>262, 264</sup>.

Les mutations N155H et Q148R/H/K ont été identifiées comme la signature de la résistance à la raltégravir et à l'elvitégravir chez les patients en échec<sup>262</sup> (Figure 24)<sup>213</sup>. Toutefois, il a été décrit récemment que la mutation Y143R/C est responsable d'une forte réduction de la susceptibilité aux inhibiteurs d'intégrase<sup>265</sup>, surtout au raltégravir.

Par ailleurs, plusieurs mutations secondaires telles que L74M, T97A, E138K, G140/S/A/C, E92A/Q, G163K/R, V151I et D232N ont été observées chez les patients en échec<sup>262, 263</sup>. Ces mutations ont peu ou pas d'effet en absence des deux mutations majeures, N155H et Q148R/H/K<sup>262</sup>. Cependant, les mutations E92Q et S147G sont particulièrement impliquées dans la résistance à l'elvitégravir<sup>262</sup>.

Récemment, deux voies de résistance ont été observées avec les mutations secondaires<sup>263</sup>. La première concerne les mutations L74M, E138K et G140A/S en association avec la mutation majeure Q148R/H/K. La seconde voie regroupe les mutations L74M, E92A/Q, T97A, Y143H/C, V151I, G163K/R et D232N en association avec la mutation majeure N155H<sup>263</sup>.

La nouvelle molécule appelée dolutégravir suscite de l'espoir pour les inhibiteurs de d'intégrase. Cette molécule est active sur l'ensemble des souches du VIH avec un IC50 de 0,22-0,62nM pour

le VIH-1 groupe M, 0,87nM pour le groupe O et 0,29nM pour la VIH-2<sup>266</sup>. Cependant, en phase III d'essai clinique, le VIH montre déjà qu'il peut développer des résistances contre cette nouvelle molécule. Les premières études de passage montrent qu'après 8 semaines, les mutations majeures connues comme N155H et Q148R/H/K pour d'autres molécules de la classe apparaissent. La mutation mineure E92Q est également observée<sup>267, 268</sup>. L'étude de la résistance phénotypique montre que la mutation N155H et E92Q montre des niveaux de résistance faible avec un « *fold change* » (FC) respectif de 2-3,9 et 2,9-4nM comparativement à la mutation Q148R/H/K qui montre un très haut niveau de résistance<sup>267, 268</sup>.

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE INHIBITORS					
	E	Y	Q	N	
Raltegravir <sup>2a</sup>	92	143	148	155	
	Q	R	H	H	
		H	K		
		C	R		MUTATIONS

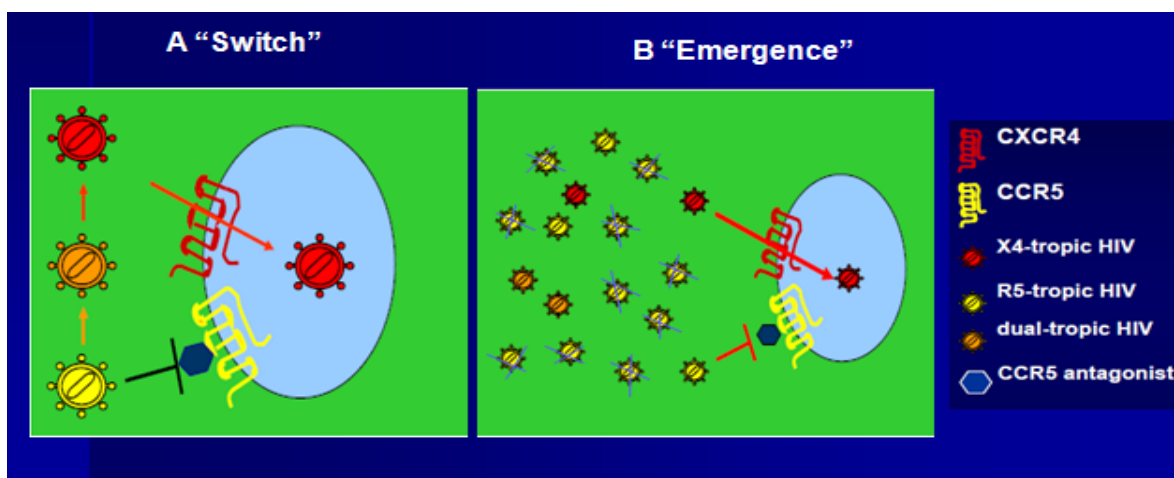
**Figure 24.** Mutations de résistance aux IIN selon «international AIDS society» 2011<sup>213</sup>

#### 1.5.2.2.6 Résistance aux Inhibiteurs de corécepteur CCR5

Après la première liaison CD4-gp120, le changement de conformation de gp120 va permettre au complexe CD4-gp120 de se lier aux corécepteurs soit CXCR4 ou CCR5. La boucle V3 de gp120 est fortement impliquée dans cette liaison et détermine l'utilisation du corécepteur<sup>269</sup>. Les inhibiteurs de CCR5 se fixent dans une poche située au niveau transmembranaire de CCR5. Cette fixation des inhibiteurs modifie la conformation de CCR5, particulièrement la boucle extracellulaire ECL2. Ainsi, la boucle V3 de gp120 ne peut plus interagir avec CCR5.



La résistance aux inhibiteurs de CCR5 s'effectue selon deux voies distinctes. La première est le changement de corécepteurs ou « *switch* ». Plusieurs études ont pointé du doigt presque tous les domaines de gp120 (V1/V2, V3, C1, C2, C3, C4 et gp41) dans la détermination du tropisme des virus<sup>270</sup>. Ceci montrant qu'il reste du chemin à faire dans la compréhension de ce mécanisme. Cependant, les études montrent que la boucle V3 est le principal déterminant de la préférence d'utilisation de l'un ou l'autre des corécepteurs<sup>271, 272</sup>. D'ailleurs, certains acides aminés de la boucle V3 sont fortement utilisés pour prédire le tropisme connu sous le nom de la règle 11/24/25<sup>273</sup>. Cette règle stipule qu'une charge positive de ces résidus détermine l'utilisation de corécepteur CXCR4, dans le cas contraire (résidus négatifs) c'est le corécepteur CCR5 qui est utilisé. Ainsi, toute mutation chez les virus rendant ces résidus positifs conduit à l'utilisation des corécepteurs CXCR4 alors qu'ils utilisaient précédemment CCR5. Ce phénomène est connu sous le nom de « *switch* » (figure 25A). Cependant, récemment, d'autres mutations fortement impliquées dans le switch en dehors des positions 11,24 et 25 sur la boucle V3 ont été rapportées. Ces mutations sont : 301N, 302N, 304R, 308R, 309I, 309I, 310Q, 316A, 317F, 328Q<sup>270</sup>. Ceci élargit le champ des mutations potentiellement impliquées dans le switch et la résistance aux inhibiteurs de CCR5. Par ailleurs, il est probable que le principal mécanisme de résistance soit la sélection de souches CXCR4 préexistantes<sup>274</sup> par la pression de sélection en présence des inhibiteurs de CCR5 (figure 25B). Ceci a été démontré lors d'analyse clonale de souches émergentes suite à l'échec au traitement par le maraviroc lors d'un essai clinique<sup>275</sup>.



**Figure 25:** Mécanisme de résistance aux corécepteurs CCR5. A) changement de corécepteurs avec utilisation CXCR4. B) Sous pression, les inhibiteurs de CCR5 éliminent (croix bleues) les virus R5, favorisant ainsi l'émergence des virus X4. Image originale de Dr Anne Geneviève Laboratoire de virologie Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris). [http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires\\_desc/2008-mai/rARV-descmai08-marcelin.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2008-mai/rARV-descmai08-marcelin.pdf)

La deuxième voie de résistance est l'apparition des mutations qui rendent possible l'utilisation de CCR5 malgré la présence de l'inhibiteur<sup>276</sup> (figure 26). Deux sites distincts sont impliqués dans la liaison de gp120 avec CCR5, le « *bridging sheet* » et la boucle V3. Le bridging sheet se lie à la partie N-terminal de CCR5 tandis que la boucle V3 établit une liaison avec le domaine ECL2. Plusieurs études montrent que les inhibiteurs de CCR5 modifient surtout la configuration d'ECL2<sup>277-279</sup>. Ainsi, le mécanisme de résistance avancé suite à ce constat est que le virus utiliserait moins l'ECL2 et devient plus dépendant de la liaison N-terminale de CCR5 pour l'infection. Ainsi, pour ces virus résistants l'interaction de V3 avec ECL2 n'est plus nécessaire pour l'infection<sup>280</sup>. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le VIH-1 et VIH-2 débarrassés de la boucle V3 sont capables d'infecter les cellules et de se répliquer<sup>278, 279</sup>. Une autre possibilité est le fait que les mutations peuvent changer la conformation de la boucle V3 en lui donnant

l'aptitude d'interagir avec le CCR5 malgré le changement de conformation de ce dernier par la présence de l'inhibiteur.



**Figure 26.** Mécanisme de résistance aux corécepteurs CCR5 avec utilisation de CCR5 des malgré la présence de l'inhibiteur. Image originale de Dr Anne Geneviève Laboratoire de virologie Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris). [http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires\\_desc/2008-mai/rARV-descmai08-marcelin.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2008-mai/rARV-descmai08-marcelin.pdf)

Plusieurs mutations impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de CCR5 sont observées. Certaines mutations sont spécifiques aux inhibiteurs. In vivo, plusieurs mutations au niveau de la boucle V3 comme G11S + I26V, S18G + A22T, A19S + I26V, I20F + A25D + I26V et I20F + Y21I jouent un rôle important dans la résistance au maraviroc chez les virus R5<sup>281</sup>. Par contre, *in vitro*, c'est l'émergence des mutations A21T et I28V au niveau de la boucle V3 qui est associée à la résistance au maraviroc<sup>282</sup>. L'émergence in vivo de certaines mutations au niveau de la boucle V3 conférant la résistance au vicriviroc a été aussi décrite. Il s'agit des mutations K10R, T12I,

F21I, T23R et G24E. Ces mutations entraînent une résistance partielle au vicriviroc et totale quand elles sont associées à la mutation S11P<sup>283</sup>.

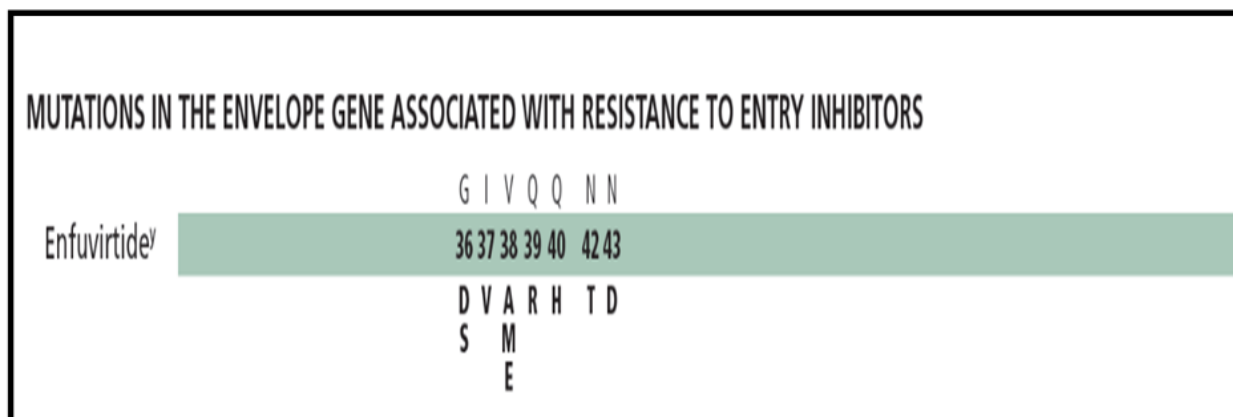
Très récemment, dans notre laboratoire, l'étude de Milan *et al* a montré que plusieurs mutations au niveau des boucles V1-V5 et de gp41 après passage in vitro du virus CC1/85 avec des concentrations croissantes de maraviroc étaient associées à la résistance à cette molécule. La mutation V169M au niveau de la boucle V2, L371W au niveau de V3, I412T pour V4, K467T, D468N, T469N, S470 et T474N pour la boucle V5 ont été observées. Les mutations A621T, E671A, L785W, L829I, I838V et Y846C ont été observées au niveau de gp41. Le test phénotypique a montré que les mutations V169M (V2) et L317W (V3) étaient associées à une faible augmentation du FC avec 1,11 et 1,33 respectivement comparativement au type sauvage. Par contre, la mutation I412T au niveau de la boucle V4 était associée à une importante augmentation de FC= 3,2 comparé au type sauvage. Ceci montre que la mutation I412T a un impact au niveau de la résistance au maraviroc<sup>284</sup>. Cependant, la signification clinique de la plupart des mutations aux inhibiteurs de CCR5 reste inconnue<sup>213</sup>.

#### **1.5.2.2.7 Résistance aux inhibiteurs de fusion (T20)**

La dernière étape de l'entrée du virus est la fusion assurée par gp41 de l'enveloppe virale. Après fixation au corécepteur, le gp120 change encore de conformation libérant ainsi gp41 qui s'enfonce dans la membrane cellulaire. Par la suite, il se replie sur lui-même par interaction de deux portions, le HR1 et le HR2 induisant ainsi le rapprochement des deux membranes virale et cellulaire. Les inhibiteurs de fusion empêchent ce repliement et par conséquent la fusion. La

seule molécule approuvée dans cette classe est l'enfuvirtide. L'enfuvirtide est un peptide de synthèse de 36 acides aminés qui mime la portion RH2 de gp41 et se lie sur la portion HR1, empêchant ainsi la fusion.

Le mécanisme de résistance à l'enfuvirtide est lié à l'apparition de mutations dans la portion HR1 au niveau des acides aminés 36 à 45<sup>285</sup>. Ces mutations empêchent la fixation de l'enfuvirtide et conduisent donc à la résistance à cette molécule. Plusieurs autres mutations toujours dans la portion RH1 comme Q40H/K/P/T, N42D/T, N43D/K/S, N42T+N43S, L44M et L45M ont été observées comme étant associées à la résistance à l'enfuvirtide<sup>286</sup> (figure 27)<sup>213</sup>.



**Figure 27.** Mutations de résistance à l'enfuvirtide selon «*international AIDS society*» 2011<sup>213</sup>

### 1.5.2.3 Types de résistance

Trois grands types de résistance ont été décrits à ce jour. La résistance aux antirétroviraux peut être naturelle, primaire ou secondaire.

### **1.5.2.3.1 Résistance naturelle**

La résistance naturelle est un manque total de sensibilité du virus aux traitements antirétroviraux. C'est le cas par exemple du groupe O du VIH-1 ou encore le VIH-2 qui résistent naturellement aux INNTI. Ces deux virus portent de façon naturelle un polymorphisme en position 181 où la tyrosine est remplacée par la cystéine/isoleucine ou encore la leucine à la place de la tyrosine en position 188<sup>287</sup>. Les résistances naturelles sont simplement le reflet que les médicaments antirétroviraux sont développés à partir des sous type B. Étant donné que la différence au niveau du génome entre les virus de groupes différents de même type est déjà significative, il est évident d'observer une très grande différence entre les virus de type différents comme le VIH-1 et le VIH-2. Par exemple, le groupe O du VIH-1 montre une homologie de seulement 50% avec le groupe M. De ce fait, il n'est pas étonnant d'observer de telles conséquences sur les traitements.

### **1.5.2.3.2 Résistance primaire**

La résistance primaire est définie comme une résistance à une ou plusieurs classes de médicaments antirétroviraux observée chez les patients non précédemment exposés à un traitement ARV. Elle est consécutive à une transmission de souches déjà résistantes. Le premier cas de la transmission de virus résistant a été observé avec la thérapie utilisant l'AZT<sup>288</sup>. Aujourd'hui, la transmission de la résistance est devenue un phénomène courant à cause d'une large utilisation des ARV<sup>289</sup>. De ce fait, le suivi de ce type de résistance devient essentiel, surtout dans les pays où la disponibilité des médicaments de deuxième ligne est limitée et où le bon choix de première ligne est vital pour un traitement efficace<sup>289</sup>. C'est ainsi que l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) recommande la surveillance de la transmission de la résistance comme approche globale de soins pour le VIH dans les pays à ressources limitées<sup>290</sup>.

Plusieurs facteurs contribuent à l'émergence de la résistance dans une population donnée. Elle est surtout liée au nombre de patients recevant le traitement antirétroviral, à l'adhérence au traitement, et à l'efficacité des régimes utilisés<sup>289</sup>. Par ailleurs, l'utilisation de la névirapine en monothérapie a beaucoup contribué à l'émergence de virus résistants et par conséquent favorise leur transmission. Ainsi, dans les régions où le traitement antirétroviral est disponible depuis longtemps comme les pays industrialisés, la prévalence de la résistance primaire peut atteindre les 25%<sup>291, 292</sup>. Aux États-Unis, elle se trouve entre 16-25% et 9-14% en Europe occidentale<sup>289</sup>. Au Canada, la résistance primaire a subi une diminution dramatique en 2003. La prévalence, qui était de 13% entre 1997-2000, est passée à 4% entre 2001-2003. Ceci coïncidait avec une diminution de la charge virale chez les patients chroniquement infectés à cause de l'accès systématique de génotypage et la disponibilité des antirétroviraux puissants<sup>293</sup>. Toutefois, la prévalence s'est stabilisée autour de 9% selon le rapport 2010 Santé Canada<sup>294</sup>. Dans les pays à ressources limitées, il est probable que l'émergence de la résistance évoluera en fonction de l'accès aux traitements. La prévalence de cette résistance primaire a été peu étudiée en Afrique. Toutefois, les quelques études semblent montrer que la transmission de la résistance semble être une réalité.

Les modèles mathématiques avaient prévu une prévalence <5% dans les pays à ressources limitées avec une large utilisation des ARV<sup>295, 296</sup>. Dans le cadre de la surveillance de la résistance, l'OMS s'est fixé comme objectif de ne pas dépasser ce seuil (5%)<sup>297</sup>

Malheureusement, plusieurs pays d'Afrique subsaharienne ont franchi cette estimation. Le tableau 2 montre les prévalences de quelques pays d'Afrique subsaharienne<sup>298-307</sup>. Certains pays comme le Burkina Faso, le Mali, l'Ouganda et l'Afrique du Sud montrent même une augmentation de la prévalence dans le temps. Cependant, la plupart de ces études sont réalisées sur un nombre d'échantillons limité.

L'Afrique vient de commencer la thérapie antirétrovirale et des prévalences supérieures à 5% peuvent être considérées alarmantes, si l'on sait que l'accès aux thérapies de deuxième ligne est difficile. Ces données supportent les recommandations de l'OMS pour la surveillance de la transmission de la résistance dans les pays en développement

Les mutations fréquemment observées sont généralement en rapport avec les médicaments utilisés dans les différentes régions. Dans la revue de littérature de Phillip, la mutation M184V, qui entraîne la résistance à la lamivudine et l'emtricitabine, était fréquemment observée dans plusieurs études réalisées en Afrique subsaharienne<sup>289</sup>. D'autres mutations comme le M41L, K219E/N/Q/R et T215/F/Y/C/D étaient observées au niveau des INTIs. Au niveau des INNTIs, les mutations K103N, Y181C et Y188C/H/L étaient les plus fréquentes.



Pays	Années de l'étude	Nombre de patients	Prévalence (%)	Références
Burkina Faso	2006	97 (naïfs)	8,2	Vergne et al <sup>298</sup>
Burkina Faso	2009	104 (naïfs)	12,5	Denis et al <sup>299</sup>
Mali	2007	98 (naïfs)	2	Derache et al <sup>300</sup>
Mali	2008	198 (naïfs)	11,5	Derache et al <sup>301</sup>
Ouganda	2008	46 nouvellement infectés	<5	Ndembi et al <sup>302</sup>
Ouganda	2011	77 nouvellement infectés	8,6	Ndembi et al <sup>303</sup>
Cameroun	2006	102 patients (naïf)	7,8	Vergne et al <sup>298</sup>
Côte d'ivoire	2003	107 (naïfs)	5,6	Thomas et al <sup>304</sup>
Côte d'ivoire	2007	100 (naïfs)	6	Thomas et al <sup>305</sup>
Afrique du sud	2009	425 (naïfs)	2,3	Huang et al <sup>306</sup>
Afrique du sud	2011	408 nouvellement infectés	7	Price et al <sup>307</sup>

**Tableau.2** : Prévalence de la résistance primaire dans quelques pays d'Afrique subsaharienne.

Concernant les IP, les mutations accessoires étaient majoritairement observées par rapport aux mutations majeures<sup>289</sup>. Cela pourrait être lié à une barrière de résistance plus élevée des IP. De plus, les IP sont moins utilisés en première intention surtout dans la thérapie en Afrique. Ces données nous montrent combien il est important de mesurer la résistance primaire. Une bonne connaissance de celle-ci permet d'évaluer de façon indirecte l'efficacité des traitements et de déterminer les traitements optimaux pour des régions données afin d'agir sur le risque de transmission.

### 1.5.2.3.3 Résistance secondaire

On parle de résistance secondaire lorsque les mutations de résistance sont sélectionnées sous la pression médicamenteuse chez un patient recevant un traitement antirétroviral. Plusieurs facteurs sont responsables de l'émergence des mutations de résistance chez un patient. L'utilisation d'une mauvaise combinaison d'ARV, l'adhésion aux traitements, les interruptions de traitement et l'insuffisance des concentrations plasmatiques du médicament sont autant de facteurs qui influencent l'émergence de mutations de résistance. Les mutations de résistance sont observées partout où les ARV sont utilisés. Leur prévalence est variable en fonction des régions et de la durée de suivi des patients. La plupart des études ne sont pas effectuées sur une même durée et compliquent les comparaisons de prévalence. Toutefois, il est connu que la prévalence de la résistance augmente au fil du temps. Les études effectuées approximativement dans le même temps montrent des prévalences comparables entre les pays industrialisés et les pays en développement. Par exemple en Côte d'Ivoire, une étude a montré une prévalence de 26,6% sur 24 mois de traitement<sup>308</sup>. Cette prévalence est comparable au 33,9% observé en Italie sur 24 mois de traitement<sup>309</sup>. Mais, elle est surtout comparable au 25% observé au Canada en 2005 chez 1191 patients utilisateurs de drogues injectables (UDI) suivis pendant 30 mois de traitement avec le même régime thérapeutique (stavudine/lamivudine/nevirapine) largement utilisé dans les pays à ressources limitées<sup>310</sup>. Lima et al ont effectué récemment une étude sur la résistance secondaire au Canada auprès de 1820 patients suivis pendant 7 ans (2000-2007): 833/1820 des patients avait une mutation de résistance à au moins une des trois classes de médicaments (INTI, INNTI et PI) utilisés dans cette étude, soit une prévalence de 46%<sup>311</sup>. Cependant, cette valeur doit tenir compte du temps de suivi. L'étude en Côte d'Ivoire a montré une augmentation de près de deux fois par année de suivi, soit 14,2% en 1 an à 26,6% après 2 ans<sup>308</sup>. Considérant cette étude sur 7 ans, la

prévalence de la résistance secondaire au Canada peut être considérée acceptable. Ceci peut être le fruit des meilleures conditions de suivi et la disponibilité des IPs renforcés par le ritonavir dans les régimes thérapeutiques dans ce pays.

#### **1.5.2.4 Méthode d'évaluation de la résistance**

Les mutations touchent toutes les protéines cibles du VIH comme la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. Les mutations de résistance sont une menace importante contre les avancées effectuées dans la thérapie antirétrovirale. Ainsi, leur détermination est une priorité pour améliorer l'efficacité des traitements. Aujourd'hui, deux méthodes sont utilisées pour évaluer les mutations de résistance : le test phénotypique et le test génotypique.

##### **1.5.2.4.1 Test phénotypique**

Le test phénotypique mesure la production du virus, en culture cellulaire exposé à des concentrations croissantes d'antirétroviraux. On détermine ainsi les concentrations inhibitrices 50% et 90% ( $CI_{50}$  et  $CI_{90}$ ), capables d'inhiber respectivement dans 50 et de 90% de la réplication virale. Les virus résistants sont capables de se multiplier en présence d'une concentration d'antirétroviraux qui inhibent la réplication des virus sensibles. Ce phénomène se traduit par une augmentation de la  $CI_{50}$  ou de la  $CI_{90}$  par rapport à une souche sensible de référence ou une souche du même patient obtenu précédemment. La technique la plus utilisée actuellement repose sur la production de virus recombinant à partir de l'ARN viral plasmatique des patients. L'interprétation des tests phénotypique est basée sur la mesure du FC, défini comme le rapport

des IC50 du virus mutant par rapport au type sauvage. Cette interprétation utilise également des valeurs seuil biologique ou encore clinique. La valeur seuil biologique est déterminée à partir des virus des patients naïfs de tout traitement antirétroviral et basée sur la variation naturelle de la sensibilité phénotypique des médicaments. La valeur seuil clinique, quant à elle, est déterminée à partir des virus des patients sous traitement antirétroviral et basée sur la variation de la sensibilité phénotypique des médicaments avant et après la perte de la réponse virologique. Les tests phénotypiques montrent une certaine limite, surtout par rapport à l'établissement et la validation des valeurs seuil<sup>312</sup>. Par exemple, certaines mutations transitoires ne montrent aucun effet par les tests phénotypes, et pourtant pourraient finir par être des mutations de résistance. L'exemple parfait est la mutation en position 215: Bien que les mutations T215C/D/E/S n'entraînent pas de résistance phénotypique aux INTIs, elles sont transitoires vers le codon sauvage 215T ou vers les mutations T215Y/F qui entraînent la résistance aux INTIs.

#### **1.5.2.4.2 Test génotypique**

Le test génotypique est basé sur l'analyse des séquences des gènes viraux ciblés par la thérapie. Elle cherche la présence de mutations à l'origine des résistances phénotypiques ou cliniques. Ce test détermine si les codons sont de type sauvage, muté ou mixte. L'analyse des séquences est assurée par la technique de séquençage qui permet de connaître l'enchaînement des nucléotides dans l'ADN.

Le séquençage a été découvert en 1977 par deux équipes différentes qui ont mis au point deux méthodes distinctes. L'équipe de Maxam aux États Unis a développé une méthode basée sur la

dégradation chimique de l'ADN, alors que l'équipe de Sanger en grande Bretagne utilisait la synthèse enzymatique. Les deux équipes ont été récompensées par le prix Nobel de chimie en 1980. Aujourd'hui appelée séquençage conventionnel, la méthode de Sanger a eu plus de succès. Ici, nous nous focaliserons sur cette méthode. Rappelons que la synthèse de l'ADN se fait par polymérisation des nucléotides grâce à l'ADN polymérase. La synthèse est initiée à partir d'une amorce en présence des nucléotides. Les nucléotides sont incorporés via leur groupement OH en position 3'. Ainsi, le principe du séquençage de Sanger est basé sur l'utilisation des nucléotides modifiés en position 3' où le groupement OH est remplacé par un H. Ces nucléotides peuvent être aussi fluorescents par l'utilisation de fluorochrome de couleurs différentes pour permettre leur identification. Les nucléotides modifiés sont appelés terminateur de chaîne, car leur incorporation dans la nouvelle chaîne entraîne l'arrêt de la polymérisation. Il en résulte des fragments de tailles différentes qui sont séparés par électrophorèse sur gel. La révélation se fait à l'aide d'un lecteur de couleur et l'interprétation des résultats se fait avec des programmes informatiques. Aujourd'hui, la méthode de Sanger est entièrement automatisée. Par contre, la limite majeure de cette technique est son incapacité à détecter les séquences présentes minoritairement dans la population de séquences. Dans le cas du VIH, il a été montré que le séquençage conventionnel ne permet pas de détecter les populations minoritaires <10-20% de la population totale<sup>313</sup>. Toutefois, ces populations minoritaires sont cliniquement pertinentes, puisque sont souvent responsable d'échec virologique pour un nouveau traitement<sup>314</sup>.

Une autre méthode de séquençage différente de celle de Sanger et qui est de plus en plus utilisée aujourd'hui est le pyroséquençage. Cette technique suit les mêmes étapes que celle de Sanger. À la différence de Sanger, la révélation dans cette technique est immédiate. Le principe est basé sur

la mesure de l'activité de la polymérase en temps réel. Pour cette raison, cette technique est souvent appelée séquençage en temps réel. Dans la pyroséquençage, les nucléotides sont ajoutés un à la fois dans le milieu réactionnel qui est composé de l'ATP sulfurylase, la luciférine et la luciférase. Une fois un nucléotide ajouté, s'il correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé. Cette incorporation entraîne la libération du pyrophosphate (ppi). Le ppi est ensuite transformé en ATP par l'ATP sulfurylase. L'ATP est ensuite couplé à la luciférine par la luciférase (Figure 28)<sup>315</sup>. Le résultat de cette réaction est la libération de l'oxyluciférine qui émet un signal lumineux qui est capté par CCD (Charge Coupled device) et reproduit un chromatogramme. Au contraire, c'est à dire si le nucléotide n'est pas attendu et donc non incorporé, il est éliminé immédiatement par l'Apyrase. Un autre nucléotide est ajouté dans le milieu réactionnel jusqu'à correspondance de celui attendu par la polymérase. C'est une technique qui est beaucoup utilisée dans le séquençage en profondeur ou « *deep séquençage* ».

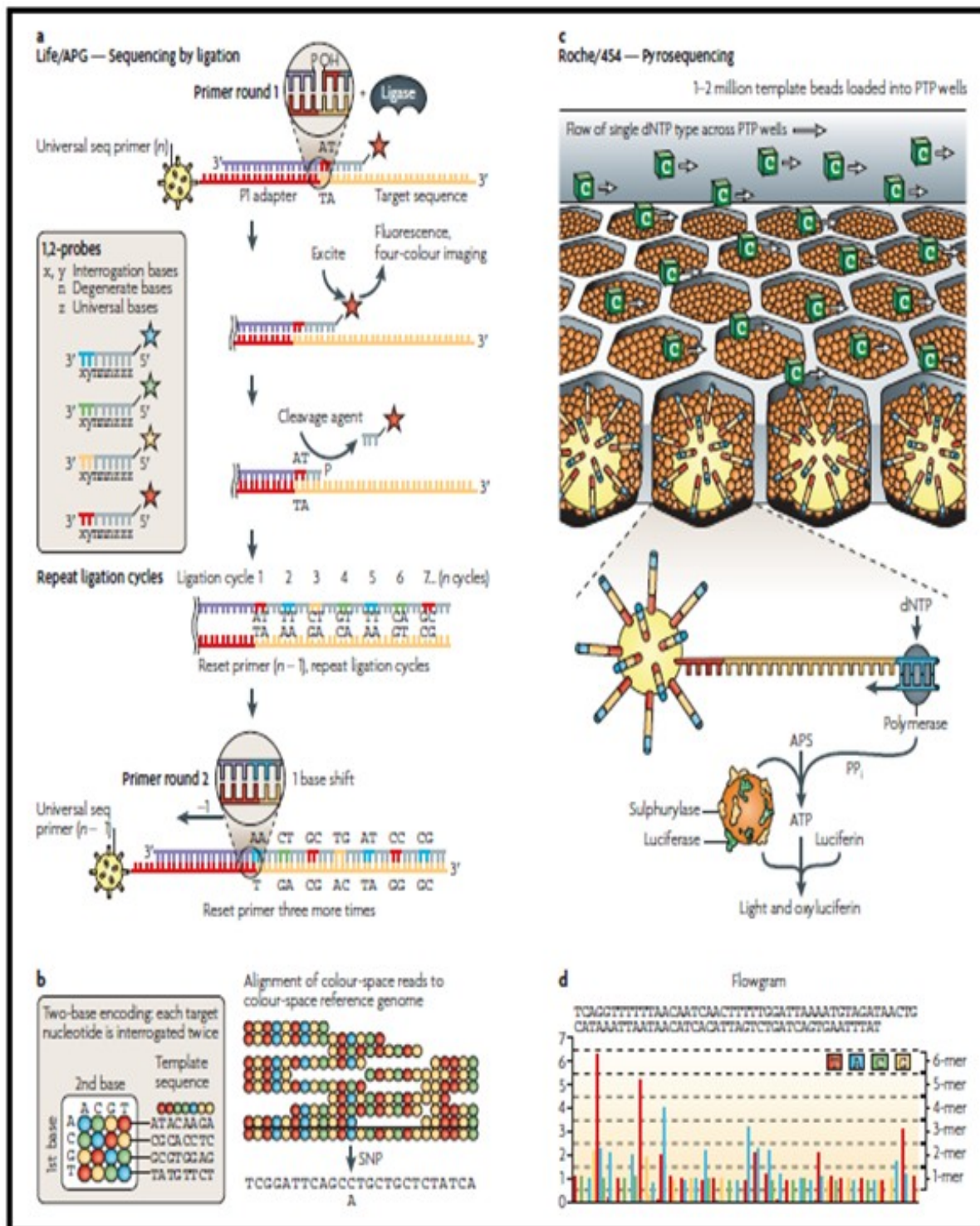
Dans le but de séquencer le génome de l'homme Neandertal, la compagnie Life Science s'est lancée dans la recherche de nouvelle technologie afin d'améliorer l'efficacité des techniques existantes. Ainsi, a vu le jour le projet 454 (Four Five Four : Facile, Fonctional and Founding). Grâce aux expériences existantes du séquençage conventionnel et l'aide de la nanotechnologie, l'ultra deep séquençage est née. L'innovation vient de la nanotechnologie avec l'utilisation de la technique des plaques en fibre optique pico titré. Chaque plaque contient 1,6 million de puits capable de contenir un seul ADN couplé à une bille. Le principe de cette technique se décompose en trois grandes étapes.

- La première étape est la fragmentation de l'ADN en morceaux de 400 à 600 paires de bases. Ensuite, les fragments sont conditionnés pour le reste du processus par l'utilisation

de deux types d'adaptateurs. Ces adaptateurs sont des minis séquences d'ADN. Un premier type d'adaptateur permet de fixer les fragments sur les microbilles. Pour l'occasion, ces microbilles possèdent à leurs surfaces des amorces complémentaires pour un seul adaptateur. Remarquons qu'il y aura autant d'adaptateurs que de fragments. Ceci permet donc de fixer un seul fragment d'ADN adapté.

- Le deuxième type d'adaptateur est général et sert d'amorce pour le séquençage. La deuxième étape est une amplification des fragments par PCR.
- Enfin l'étape de séquençage qui utilise la technique de pyroséquençage décrit ci-haut.

L'ultra deep pyroséquençage est un outil important pour la virologie. Nous avons vu précédemment que le séquençage conventionnel n'arrive pas à séquencer les populations minoritaires des quasi-espèces virales du VIH. Étant plus sensible, car chaque molécule d'ADN est amplifiée séparément, le deep séquençage trouve son heureuse application dans ce domaine. D'ailleurs, une étude effectuée récemment sur les échantillons de patients a montré que l'ultra deep séquençage détecte 392 variantes des populations minoritaires présentes à moins de <20%. Par contre, la méthode conventionnelle ne détectait que 2 de ces 392 variantes<sup>316</sup>. Par ailleurs, une étude comparative récemment réalisée auprès de 1397 patients a été réalisée entre la méthode de Sanger et l'ultra Deep séquençage. Les résultats indiquent que la majorité des mutations détectées par l'ultra deep séquençage échappaient à la méthode de Sanger. L'ultra Deep séquençage avait détecté 28% des mutations contre 14% pour la méthode Sanger<sup>317</sup>.



**Figure 28.** Pyroséquence et la technique de séquence Roche/454. A, B) technique de pyroséquence. C) pyroséquence utilisé par Roche/454. D chromatogramme. Tiré de Metzker ML. Nat Rev Genet 2010<sup>315</sup>. Avec la permission de Nature Publishing Group.



En outre, la PCR allèle spécifique est une autre technique utilisée pour l'étude des populations minoritaires de VIH. Le PCR allèle spécifique est une technique basée sur l'utilisation d'amorce spécifique à une mutation. Dans cette technique, les amorces sont choisies en fonction de la mutation. Elles sont donc complémentaires à la région variable contrairement à la PCR normale où les amorces sont choisies en fonction des régions constantes du génome. En effet, cette technique est surtout utilisée pour la recherche de mutations ponctuelles ou « *single nucleotide polymorphism* » (SNP).

Présentement, elle trouve son application en virologie dans la recherche de mutations spécifiques au sein de la population minoritaire inaccessible par la méthode de séquençage conventionnel. Très récemment Wainberg et al ont montré en utilisant cette technique que la mutation M184V était présente chez les patients nouvellement infectés, alors que cette mutation est moins fréquemment observée chez ces patients par le séquençage conventionnel. Dans cette étude, les auteurs ont trouvé que 23% des patients avaient la mutation M184V en appliquant la méthode PCR allèle spécifiques contre 7% seulement quand la méthode de séquençage conventionnel est utilisée<sup>318</sup>.

#### **1.5.2.4.3 Interprétation des tests de résistance**

L'ensemble des mutations est regroupé en profil de mutation. Ces profils comportent une ou plusieurs mutations associées à la résistance à chacune des molécules d'ARV. Les profils de mutations de résistance sont complexes. Cette complexité a conduit la mise en place des bases de données et l'élaboration des algorithmes permettant leur interprétation. Les algorithmes mettent

en corrélation des informations issues des expériences de test de sensibilité aux médicaments in vitro pour chaque molécule (phénotype), l'histoire thérapeutique des patients et les tests génotypiques<sup>289</sup>. Ainsi, plusieurs algorithmes ont vu le jour, notamment l'algorithme de « *Los Alamos HIV-1 resistance mutation database* » (version 2009), de « *Stanford HIVdb drug resistance interpretation algorithm* » (version 6.05), de « *International AIDS Society-USA (IAS-USA)* », de « *Rega Institute drug resistance interpretation algorithm* » (Version 8.02) et le phénotype virtuel antivirogramme de Virco. Les résultats sont généralement rapportés comme étant sensibles, intermédiaires ou résistants. Cependant, l'interprétation des résultats de prédiction peut varier selon les algorithmes. Ceci est beaucoup plus marqué quand ils sont appliqués aux sous-types non-B car les algorithmes ont été principalement construits basés sur des résultats provenant de sous-type B. L'étude de Yebra et al en 2010, auprès de 354 patients naïfs, dont 128 infectés par un sous-type B et 226 par un sous-type non-B a montré que les algorithmes affichent un haut niveau de discordance quand ils sont appliqués aux sous-types non-B<sup>319</sup>. Très récemment une autre étude a révélé une large discordance des algorithmes dans leur interprétation de résistance chez le groupe O du VIH-1. Les mutations mineures au niveau de la protéase constituaient 75% de discordance entre les algorithmes<sup>320</sup>. Ce constat est en fait général, car plusieurs polymorphismes sont observés au niveau de la protéase. À cause des divergences et dans le but d'harmoniser les interprétations de la résistance à des fins de surveillance épidémiologique, l'OMS a donné une définition aux mutations de résistance en se basant sur quatre critères essentiels et en utilisant les plus grands algorithmes comme IAS-USA, Los Alamos HIV Sequence Database, HIVdb drug resistance interpretation algorithm (Version 4.1.9), ANRS drug resistance interpretation algorithm (Version 2005.07) et Rega Institute drug resistance interpretation algorithm<sup>321</sup>. Le premier critère est que la mutation doit être associée à

la résistance. Le deuxième indique que la mutation ne doit pas être polymorphique. Le troisième critère est que la mutation doit être sous type indépendant. Enfin, le quatrième indique que la mutation doit être observée sous pression médicamenteuse. Cependant, tout comme les algorithmes, le troisième critère pose un problème dans cette définition, car plusieurs études montrent maintenant que les mutations peuvent être sous-type dépendant.

#### **1.5.2.5 Résistance et diversité**

La majorité des infections par le VIH dans le monde est due aux sous-types non-B du VIH-1<sup>322</sup>. Cependant, les médicaments antirétroviraux ont été développés à partir des connaissances sur les sous-types B. De plus, les sous-types B ont bénéficié de plus d'études sur la résistance comparativement aux sous-types non-B. Ainsi, la connaissance des mutations de résistance chez le sous-type non-B du VIH-1 et leur pertinence clinique est limitée. Il est possible que la grande diversité du virus puisse entraîner des voies différentes de mutations de résistance entre sous-types.

Les toutes premières études montraient déjà une différence par rapport aux INNTIs. En Ouganda, les données issues des études sur la nevirapine en monothérapie chez les femmes enceintes ont montré plus de cas de résistance chez les femmes infectées par le sous-type C que celles infectées par les sous type A ou D<sup>323</sup>. Par la suite, d'autres études ont montré plusieurs différences de mutations de résistance entre les sous-types B et non-B.

Différences de mutations au niveau des INNTIs

- Plusieurs études ont montré que la mutation V106M est fréquemment observée chez le sous-type C et CRF01\_AE au cours du traitement avec l'efavirenz ou nevirapine<sup>324, 325</sup>. Par exemple, l'étude de Marconi en 2008 sur 124 patients infectés à 97,4% par le sous-type C, 19,1% avait la mutation V106M<sup>324</sup>. Toutefois, cette mutation n'est pas observée chez le sous-type B. Ce dernier développe plutôt la mutation V106A principalement associée à la résistance à la nevirapine, mais pas à l'efavirenz<sup>326</sup>. Une explication possible de cette différence réside aux nombres de changements pour aboutir à la mutation. En effet, la valine (V) en position 106 pour le sous-type B est codée par un GTA contre un GTG pour le sous-type C. Dans les deux cas, il faut une seule transition pour avoir l'alanine (GTA en GCA) pour le B et la méthionine pour le C (GTG en ATG)<sup>327</sup>. En revanche, il faut deux transitions pour avoir une méthionine chez le sous-type B (GTA en ATG). La même situation est observée pour avoir l'alanine chez le sous-type C (GTG en GCT, GCC, GCA et GCG). En outre, une étude récente réalisée en 2011 au Nigeria avec 338 patients vient de montrer que le polymorphisme V106I est significativement observé chez le sous-type G comparativement à d'autres sous-types ( $p=0,01$ )<sup>328</sup>.
- La même étude au Nigeria a montré également que le polymorphisme V90I est significativement observé chez le CRF02\_AG comparativement à d'autres sous-types ( $p=0,003$ )
- La mutation G190A a été fréquemment observée chez le sous-type C après échec aux traitements contenant les INNTIs (nevirapine, efavirenz) en Inde et Israël<sup>329, 330</sup>. Une large étude de Kantor comparant 3686 patients infectés avec un sous-type non-B et 4769 patients avec un sous-type B a montré que la mutation G190A est fréquente chez le CRF01\_AE que dans le sous-type B<sup>331</sup>. La même étude a également montré que la mutation G190E associée à la résistance aux DLV et ETR est fréquemment observée chez le sous-type C.

Différences de mutations au niveau des INTIs

Au niveau des INTIs, les études ont également montré des différences dans les voies de mutations de résistance.

- Au Botswana, une nouvelle voie de mutation associée au TAM composé de mutations 67N/70R/T251Y a été observée chez les patients infectés par le sous-type C<sup>332</sup>. Une étude au Burkina a montré que les mutations TAM sont fréquemment observées chez le CRF06\_cpx que chez les CRF02\_AG<sup>333</sup>. Au Brésil, une étude a montré que le sous-type F sélectionne préférentiellement la mutation en position 211 plutôt que 210 en présence des INTIs<sup>334</sup>. Par ailleurs, l'étude de Kantor a montré que les mutations TAM1 (M41L, L210W et T215Y) étaient moins fréquentes chez les patients infectés par les sous-types A, C et D comparativement au sous type B<sup>331</sup>. Par exemple, dans la même étude, la mutation M41L a été observée chez 6 patients infectés par un sous-type A, chez 14 infectés par un sous-type C et 10 pour les patients avec un sous-type D contre 43 patients infectés par un sous-type B.

Une étude au Nigeria vient de montrer que la mutation M41L est rarement observée chez le CRF02\_AG<sup>328</sup>. Cette même étude a montré que la voie TAM-2 (D67N, T215F, K70R et K219Q/E) est moins fréquente chez le sous-type B. Les auteurs ont également trouvé que la mutation L210W était significativement observée chez le sous-type A ( $p=0.001$ ) alors qu'elle était moins fréquente chez le CRF02\_AG et le sous-type G. En effet, l'explication proposée est le fait que pour ces deux sous-types, il faut deux mutations, une transition et une transversion pour arriver à la mutation L210W contrairement au sous-type A où une seule transversion est suffisante pour l'apparition de cette mutation. Par ailleurs, nous avons déjà montré dans notre laboratoire que cette voie est préférentiellement choisie par les sous-types K<sup>335</sup>. Dans cette étude, était inclus 801 patients VIH+ sous traitement AZT/d4T+3TC+EFV/NVP. L'analyse par

séquençage a montré que 26,1% des patients avait un sous-type K (AGK, K et AK) contre 56,5% de sous type CRF02\_AG. L'analyse des mutations de résistance a montré que les mutations TAM2 étaient observées chez 41,7% de sous-type K contre seulement 19,2% chez le CRF02\_AG.

- Plusieurs études notamment au Botswana<sup>336</sup> et Malawi<sup>337</sup> ont montré une fréquence plus élevée de la mutation K65R dans le sous-type C chez les patients sous INTI. L'étude au Botswana a observé cette mutation chez 70% des patients infectés par un sous type C en échec à un régime contenant la didanosine et la stavudine. Au Malawi, l'apparition de la mutation K65R a été observée chez 19% des patients infectés par un sous type C sous traitement stavudine, lamivudine et nevirapine. Par ailleurs, au Nigeria, il a été montré que 37/338 patients (10,9%) avaient la mutation K65R et plus de la moitié 21/37 (56,8%) étaient infectés par le CFR02\_AG<sup>338</sup> et non un sous type C. Parmi les patients avec cette mutation 35% n'étaient pas sous un régime avec ténofovir, mais stavudine, zidovudine ou lamivudine. Ces observations véhiculent deux informations essentielles: la première est que d'autres sous types que C commencent à montrer une fréquence élevée de la mutation K65R. La deuxième est une menace de la deuxième ligne thérapeutique, car cette mutation entraîne une résistance au ténofovir qui est souvent réservé pour la deuxième ligne dans les pays à ressource limitée<sup>328, 338</sup>. En outre, la mutation K65R est moins fréquente chez le sous-type A malgré l'utilisation d'un traitement antirétroviral similaire<sup>339</sup>.

*In vitro*, la mutation K65R apparaît plus rapide chez le sous-type C que le B sous tenofovir. Le mécanisme moléculaire proposé est la présence préférentielle de site de pause à la position 65

chez le sous-type C. Au regard des codons qui font changer le K en R chez le sous-type B (AAA en AGA) et C (AAG en AGG), aucune différence n'est observée. Dans les deux cas, c'est le A central qui est changé en G. Par contre, l'étude in vitro de Coutsinos et al a montré la présence d'un fort site de pause au niveau du premier A chez le sous-type C contrairement au sous-type B. Cette pause serait responsable d'une fréquence élevée de cette mutation chez le sous-type C<sup>340</sup>.

#### Différences de mutations au niveau des IP

Les inhibiteurs de protéase montrent une grande différence dans les voies de mutations de résistance entre les sous types.

- D'abord, plusieurs études ont montré qu'au cours du traitement avec nelfinavir (NFV), la mutation D30N n'apparaît jamais chez les patients en échec infectés par le CRF02\_AG et CRF01\_AE<sup>341, 342</sup>. Cette mutation est la voie classique de résistance au nelfinavir chez le sous type B. La mutation D30N est significativement moins fréquente chez le sous-type C (6%) comparativement au sous type B (38%)<sup>343</sup>. Par contre, c'est la mutation 88S qui a été observée chez les patients sous nelfinavir infectés par le CRF01\_AE et chez les patients sous indinavir infectés par le sous-type B<sup>341, 342</sup>.
- La mutation L90M est plus fréquente chez le sous-type F que chez les sous-types B en provenance du Brésil<sup>344</sup>. Sous nelfinavir, le sous-type G sélectionne la mutation L90M contrairement au sous-type B qui préfère la voie classique avec la mutation D30N.
- La mutation M89I/V a été observée dans les sous-types F, G et C mais pas dans d'autres sous-types<sup>345</sup>.

- La mutation K20R a été observée à plus de 25% chez le sous-type A comparativement au sous-type B<sup>328</sup>. Pour K20I, il est largement observé chez les sous-types G, CRF02\_AG et CRF06\_cpx. Par contre, il est complètement absent chez le sous-type A.
- Plusieurs mutations au niveau d'autres positions ont été rapportées. Souvent, ces mutations sont considérées comme des polymorphismes chez les sous-types non-B. Par exemples, les mutations I13V, M36I et H69K sont observées entre 90 à 100% chez les sous-types non-B particulièrement le CRF02\_AG, CRF06\_cpx et le sous-type G<sup>324, 328</sup>. Certaines de ces positions sont étudiées chez le sous-type B et souvent impliquées dans la résistance aux IP. Par contre, chez le sous-type non-B, leur implication dans la résistance aux IP reste à déterminer. C'est le cas par exemple de la mutation L10I qui est présente à plus de 25% chez le sous-type A comparativement au sous-type B<sup>328</sup>. Il a été aussi montré que les mutations 10I et 10V sont plus fréquentes chez le CRF02\_AG et le sous-type G<sup>331</sup>.

Des études sont nécessaires pour évaluer l'impact de la diversité génétique sur la résistance, surtout dans les régions où circulent plusieurs sous-types et formes recombinantes<sup>312</sup>. Même si les patients infectés par des sous-types non-B répondent aux traitements antirétroviraux actuels, il est important de mieux comprendre les voies de résistance chez ces sous-types afin de fournir plus de données aux algorithmes d'interprétation de résistance et améliorer ainsi le traitement antirétroviral.



## 1.6 Hypothèses de recherche et objectifs

### 1.6.1 Hypothèse de recherche

Depuis peu, l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays en développement a été facilité grâce à des programmes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), du Fonds Mondial International (FMI) et du « *President's Emergency Plan For AIDS Relief* » (PEPFAR). Dès lors, les ARV sont devenus gratuits dans la plupart des pays en développement comme le Mali, permettant ainsi leur utilisation accrue. Cependant, dans ces pays, le manque d'infrastructures médicales adéquates, les ruptures de stock, la difficulté à gérer les effets secondaires, et/ou les grandes distances à parcourir pour l'accès aux soins sont autant d'obstacles pouvant contribuer à l'émergence de la résistance aux ARV.

Plusieurs études suggèrent que les sous-types non-B et B ont des profils différents de mutation de résistance aux ARV. Plusieurs polymorphismes ont été également observés chez le sous-type non-B du VIH-1, notamment dans le gène de la protéase. Très souvent, les mêmes polymorphismes sont observés chez le sous-type B du VIH-1. Certains polymorphismes ont été étudiés chez le sous-type B, notamment la mutation L10I/V, dont le rôle a été établi dans la résistance aux IPs. Par contre, les connaissances sur l'impact de ce polymorphisme au niveau des sous-types non-B sont très limités et cet aspect est important à caractériser.

Dans ce contexte, nous proposons l'hypothèse selon laquelle l'utilisation accrue des ARV dans les pays en développement et les différences dans les profils de mutations entre sous-types B et non-B entraînent: 1) une prévalence élevée de la résistance et 2) un profil de mutation de

résistance spécifique à certains sous-types non-B. Nous avons testé cette hypothèse dans le cadre d'une étude effectuée sur une cohorte de sujets infectés par le VIH-1 de sous-type non-B enrôlés au Mali pour recevoir la thérapie antirétrovirale. Trois objectifs ont été proposés pour tester cette hypothèse.

### **1.6.2 Objectifs de recherche**

- Objectif 1: Mesurer la prévalence de la résistance primaire.
- Objectif 2: Caractériser les voies de résistance chez les patients en échec au traitement.
- Objectif 3: Déterminer *in vitro* l'impact du polymorphisme L10I/V dans la résistance aux IP chez le sous-type CRF02\_AG.

## **2. Résultats**

## **2.1 Article1 : Haut niveau de résistance primaire au Mali**

Ce travail a fait l'objet de publication dans la revue *HIV Medicine* (2010 Jul 1;11(6):404-11) et l'article correspondant est exposé ci-dessous dans sa version finale telle que publiée.

Dans cet article, Alpha Haidara en collaboration avec Annie Chamberland et Mohamed Sylla, a réalisé les expériences de biologie moléculaire (Extraction d'ARN, PCR et séquençage) et l'analyse phylogénétique des séquences. Alpha Haidara a également écrit le manuscrit sous la supervision de sa directrice de recherche Pr Cécile Tremblay.

## High level of Primary Resistance in Mali

A Haidara<sup>1</sup>, A Chamberland<sup>1,2</sup>, M Sylla<sup>2</sup>, SA Aboubacrine<sup>3</sup>, M Cissé<sup>4</sup>, HA Traore<sup>3</sup>, MY Maiga<sup>5</sup>, A Tounkara<sup>3</sup>, VK Nguyen<sup>1</sup> and C Tremblay<sup>1,2</sup> for the Appuyer le Traitement Anti-Rétroviral en Afrique de l'Ouest (ATARAO) Group 1

<sup>1</sup>Departement de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada,

<sup>2</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,

<sup>3</sup>Hopital national du Point-G, Bamako, Mali <sup>4</sup>CESAC, Bamako, Mali and <sup>5</sup>Hopital Gabriel Touré, Bamako, Mali.

Keywords: HIV subtypes, mutations, primary resistance

## Abstract

### Background

As access to antiretroviral drugs increases in developing countries, it will become increasingly important to monitor the emergence of resistance and to define the molecular pathways involved to identify optimal therapeutic regimens.

### Methods

We performed genotypic resistance testing on plasma obtained from 101 HIV-infected treatment naive individuals from Mali. Genotyping was carried out using the Virco protocols and HXB2 was used as the reference strain.

### Results

CRF02\_AG was the most common subtype, present in 71.3% of our patient population. Other subtypes included B, C, G, CRF06\_CPX, CRF09\_CPX, CRF01\_AE, A2/CRF16\_A2D, A1 and CRF13\_CPX. A total of 9.9% [95% confidence interval (CI) 6.9–12.9%] of patients had at least one resistance mutation. The prevalences of mutations conferring resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs) were 5% (95% CI 0.7–9.2%), 6% (95% CI 1.3–10.6%) and 0%, respectively. The most frequent mutations were T215A/Y for NRTIs and K103N/T for NNRTIs. One patient harboured three NRTI resistance mutations and one NNRTI mutation. This is the first reported case of multi-drug-resistant viral transmission in Mali. Polymorphisms at protease codons 10I/V and 33F potentially associated with resistance were observed in 18.8%

and 1% of patients, respectively. Several polymorphisms in the C-terminal domain of reverse transcriptase were observed: A371V (in 63.4% of patients), G335D (76.2%), E399D (10.9%) and G333E (1%).

### **Conclusion**

Primary resistance was seen in 9.9% of subjects, which is higher than previously reported in Mali. Taking into consideration other polymorphisms in protease such as L10I/V and 33F, primary resistance could reach 28.7% (95% CI 19.9–37.5%). Our study reflects the need to monitor the evolution of resistance on a regular basis and trends of transmitted resistance.

## **Introduction**

The initiation of highly active antiretroviral therapy (HAART) in developing countries where HIV-1 non-B subtypes circulate has been associated with good clinical outcomes when combined with appropriate clinical follow up [1]. However, as HAART is scaled up, it is essential to monitor the emergence of primary resistance, as this may impact on the success of an already limited choice of first line therapies in resource-limited settings [2]. Furthermore, studies have shown that polymorphisms in non-B subtype genomes can lead to different pathways to drug resistance from those found in subtype B HIV-1 [3–5]. We have studied the rate of primary resistance in Mali; a resource limited country in West Africa. With a population of 11million inhabitants, Mali has an estimated HIV prevalence of 1.3%, representing 146 000 persons infected with HIV [6]. The first antiretroviral drugs became available in 1997, followed by roll-out of HAART through a national treatment programme in 2004 with stavudine, lamivudine and nevirapine recommended as first-line treatment [7]. A study in 2006 estimated that the overall prevalence of primary resistance in Mali was 11.5% [7]. In the context of the scale-up of HAART, we therefore decided to evaluate the evolution of primary resistance in this country.

## **Methods**

### **Study population**

A total of 101 antiretroviral-naive HIV-infected individuals from Mali were prospectively enrolled in this study. Primary resistance was evaluated during the period from July 2007 to October 2008. Individuals were recruited from three different sites in Bamako, Mali's capital: 42 patients were recruited from the Centre d'Ecoute de Soins, d'Animation et de Conseil (CESAC), which offers diagnostic services and care to HIV-infected individuals of rural and urban origin,



43 from the Gabriel Toure Hospital (HGT), and 16 from the Point G Hospital (HPG). HGT and HPG are the two largest hospitals in Mali. Although their patient populations are mainly urban, they are reference centres and see referrals from the entire country. Plasma obtained from the patients were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were sent on dry ice for genotyping at the retrovirology laboratory at the Centre Hospitalier de l'Universite de Montreal (CHUM), Montreal, Canada. This study was approved by the ethics committees of Mali and CHUM research centre.

### **Viral extraction, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing**

Viral RNA was extracted using the viral QIAamp Spin Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and according to the protocol provided by Virco (Mechelen, Belgium). It was then amplified using Superscript III HIFI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with primers 5'out and 3'RT (Virco) covering the protease and reverse transcriptase (RT-PR) genes. For the nested PCR, we used the expand HF PCR (Roche Applied Science, Quebec, Canada) as the PCR enzyme and primers 5'IN and 3'IN (Virco). Amplification conditions for the first amplification (one-step RT-HIFI) were as follows: pre-PCR,  $53^{\circ}\text{C}$  for 30 min for reverse transcription and  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min for denaturation, followed by 40 cycles ( $92^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $68^{\circ}\text{C}$  for 150 s) and then a final extension at  $68^{\circ}\text{C}$  for 7 min. For the nested PCR, the conditions were: pre-PCR,  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min for denaturation, followed by 30 cycles ( $94^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 2 min) and then a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. It should be noted that, from the 11th cycle, the time of elongation increased by 5 s for each cycle. All samples underwent two PCRs followed by a purification step of the nested product. The presence of amplicons was then confirmed by separation on a 1% agarose gel. The purification was performed using QIAprep Spin Miniprep Kit 50 (Qiagen). Sequencing was performed at Genome Quebec (McGill

University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using eight primers (Virco) covering the PR-RT genes.

### **Analysis of data**

The sequences were analysed using SEQUENCER 4.5 (Gene Code Software Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Determination of subtypes and analyses of drug resistance mutations were performed using the Virco algorithm (Virconet, [www.virconet-start.com](http://www.virconet-start.com)).

### **Phylogenetic analysis**

The sequences were aligned with references representing all subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) using CLUSTAL W version 1.83 [8], followed by manual alignment using BIOEDIT version 7.0.4.1 (IBIS Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Subtype references were selected from the Los Alamos National Library database for HIV-1 ([www.hiv.lanl.gov/](http://www.hiv.lanl.gov/)). The phylogenetic tree was constructed with MEGA software version 4.1 (Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA), using the Kimura two-parameter model (neighbor joining method) and a bootstrap value of 500 replicates. The sequences that were included were the consensus sequence for the M group and study sequences (n=101).

### **Statistical analysis**

Statistical tests were performed using SAS software version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Some data for one patient were not available, so analyses of age, sex and CD4 cell count were performed on 100 patients. Viral load (VL) and resistance prevalence analyses were performed on 101 patients. These variables are expressed as medians with interquartile ranges (IQRs). The

prevalences were determined with a confidence interval (CI) of 95%. The percentage of patients with CD4 < 200, between 200-350 and over 350 cells/mL was also calculated.

## **Results**

### **Study population**

Among the 101 subjects included in this study, 42 were enrolled at CESAC, 43 at HGT and 16 at HPG. Clinical data were lacking for one subject. Among the remaining 100 subjects, 76 were women and 24 men. The median (IQR) age was 35 (18–65) years, the median (IQR) viral load was 400 000 (225–19 000 000) HIV-1 RNA copies/mL and the median (IQR) CD4 count was 135 (1–585) cells/mL. Sixtyseven per cent of patients had a CD4 count < 200 cells/mL, 21% had a CD4 count between 200 and 350 cells/mL and 12% had a CD4 count > 350 cells/mL (Table 1).

### **Subtype distribution**

All our samples could be amplified and sequenced. The CRF02\_AG subtype was identified in 72 of the 101 samples (71.3%). The distribution of other subtypes was as follows: eight CRF06\_CPX (7.9%), six B (5.9%), four C (4%), three G (3%), two CRF09\_CPX (2%), two CRF01\_AE (2%), two A1 (2%), one CRF13\_CPX (1) and one A2/CRF16\_A2D (1%) (Fig. 1)

### **Resistance mutations**

- a) Nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and protease inhibitor (PI) mutations.

Table 2 summarizes the drug resistance mutations observed in our cohort. Out of 101 patients, 10 patients had at least one mutation from one of the three drug classes, with a clear impact on

phenotypic susceptibility for the subtypes observed. This represents a prevalence of 9.9% (95% CI 6.9–12.9%). The prevalences of mutations associated with resistance to NRTIs, NNRTIs and PIs were 5% (95% CI 0.7–9.2%), 6% (95% CI 1.3–10.6%) and 0%, respectively. The most frequent resistance mutations were T215A/Y for NRTIs and K103N/T for NNRTIs. One patient harboured three NRTI resistance mutations (M41L, M184V and T215Y) and one NNRTI mutation (K103N). This is the first reported case of multi-drug-resistant viral transmission in Mali.

#### b) Polymorphisms

Other changes in the protease gene which have been associated with resistance to PIs in subtype B isolates were observed. These were the mutations L10I/V (found in 18.80% of patients) and L33F. The effect of these mutations on resistance is not clear for non-B subtypes and they may represent polymorphisms. If we take into consideration these mutations as potential resistance mutations, the prevalence of primary resistance would increase to 28.70% (95% CI 19.89–37.53%). Phylogenetic analysis revealed that isolates with the 10I/V mutation were not epidemiologically linked.

#### c) C-terminal domain mutations

We observed several polymorphisms in the C-terminal domain of the reverse transcriptase gene (amino acids 293–560). Recent studies have identified several mutations in this domain associated with resistance in subtype B, such as E312Q, G333E/D, G335D, N348I, A360I, V365I, T369I, A371V, A376S, T377L, E399D, L469T, Q509L and K558R [39–42]. In our study we observed four of these mutations, two of which had particularly high prevalences: G335D

(prevalence 76.2%; 95% CI 67.9–84.5%), A371V (63.4%; 95% CI 54–72.8%), E399D (10.9%; 95% CI 4.8–17%) and G333E (1%; 95% CI 1–1.0%). There is little information about the effects of these mutations in the non-B subtype.

## **Discussion**

We evaluated primary antiretroviral drug resistance in Bamako, Mali using samples collected between July 2007 and October 2008. Subtype analysis showed a high frequency of the recombinant form CRF02\_AG, at 71.3% (Fig. 1). This result is consistent with a recent study conducted in Mali, which showed a frequency of 72% [7]. The frequency of this recombinant form was 75% in 2005 and 88% in 2002 [9]. There seems to have been a decline in the frequency of CRF02\_AG over time. This could be attributable to the emergence of new recombinant forms such as CRF13\_CPX and A2/CRF16-A2D which had not been described in Mali prior to this study. These new recombinant forms may reflect the diversification of the HIV-1 epidemic in this country, as a result of both migration from neighbouring countries and recombination events within the local population. This increasing diversity could lead to the emergence of new resistance pathways that could affect first-line therapy in the future.

Several studies have suggested that non-B isolates show a different pattern of resistance mutations from subtype B [10, 11]. Reports have shown that the mutation V106M confers resistance to NNRTIs in subtype C HIV [12], and is preferentially selected in vivo [13], and that the D30N mutation is not preferentially selected in HIV-1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir [14]. We have previously shown that subtype K reverse transcriptase may preferentially select for the thymidine analogue mutation 2 (TAM-2) pathways in the presence of

NRTIs [15]. Differences in the way in which resistance evolves among subtypes may mean that some second-line regimens will be less effective than previously thought. Moreover, treatment of patients with primary resistance will be compromised from the outset, potentially leading to onward transmission of drug-resistant HIV. Use of compromised treatment regimens may not result in the expected prevention benefits; that is, decreased HIV transmission. The World Health Organization (WHO) currently recommends first-line therapy with two NRTIs and one NNRTI, a combination with high efficacy, tolerability and simplicity and low cost, and showing high adherence to treatment [16]. First-line regimens in Mali are based on this recommendation. Antiretroviral drugs have been made available in Mali since 1997, and have been free since 2004. The recommended first-line regimen is a fixed-dose combination of Stavudine/lamivudine/nevirapine, currently prescribed free of charge for the majority of patients. The alternative first line regimens are zidovudine/lamivudine/efavirenz and zidovudine/lamivudine/ nevirapine. The recommended second- line regimen is abacavir/didanosine/indinavir, and the alternative drugs are tenofovir and lopinavir [7] or indinavir/ritonavir. An increase in the prevalence of primary resistance could jeopardize these second-line options.

The availability of antiretrovirals has brought great hope to HIV-infected individuals in resource-limited countries. The emergence and transmission of resistant virus could compromise the effectiveness of specific treatments in areas where therapeutic options are limited [17]. There were limited data on primary antiretroviral drug resistance before 2000 in these countries [18]. Preliminary data suggest that resistance may be emerging in countries currently scaling up access to antiretroviral therapy [19]. Data from Africa support this suggestion. Reports from Uganda, Rwanda, Mozambique and Zambia have indicated a low prevalence of primary drug resistance

mutations among treatment-naive individuals [20]. A recent study showed a rate of primary resistance of 0% in Nigeria [21]. The prevalence of primary resistance was estimated to be 4.2% in one province of South Africa in 2002–2004 [22] and 4.3% in Congo [23]. Recently, a study in Tanzania showed that primary resistance to NRTIs and NNRTIs was detected among 3% and 4% of treatment-naive patients, respectively [20]. In West Africa, the prevalence of primary resistance is estimated to be 5.6% in Cote d'Ivoire [24] and 8.3% in Burkina Faso [25]. These data support WHO's recommendation for surveillance of antiretroviral resistance in developing countries such as Mali.

In our study, we found the prevalence of primary resistance to be 9.9% (95% CI 6.9–12.9%). This rate is high compared with those found in previous studies conducted in Mali, which reported 0% in 2002 [9] and 2% in 2005 [8]. Moreover, if we include the mutations 10I/V and 33F, the prevalence becomes very high at 28.7% (95% CI 19.9–37.5%), compared with a recent study conducted in Mali, which also included the 10I/V mutation and showed a prevalence of 11.5% in 2006 [7]. This progression could reflect increasing use of antiretrovirals in this country as well as in neighbouring countries that have strong migratory ties to Mali. These results are of considerable concern, considering the rate of primary resistance in developed countries, which ranges between 10 and 20% [26].

NRTI resistance-associated mutations (M41L, D67N, M184V, L210W, T215A/Y and K219E) were present in five patients (Table 2). They were mostly thymidine-associated mutations (TAMs) with the exception of one patient who harboured M184V, which confers resistance to lamivudine. One patient harboured three NRTI resistance mutations (M41L, M184V and T215Y)

and one NNRTI resistance mutation (K103N). This is the first reported case of multidrug-resistant viral transmission in Mali. NNRTI resistance mutations (K103N, V108I, V179E and Y181C) were observed in six patients (Table 2). Three of them had a K103N/T mutation and the other three had V108I, V179E and Y181C mutations. These mutations confer cross-resistance to most NNRTIs and could eventually compromise the use of second-generation NNRTIs. The patterns of mutations observed in our study are compatible with widespread use of Triomune which contains nevirapine, stavudine and lamivudine, and the use of efavirenz and zidovudine as first-line therapy in Mali.

We did not observe PI mutations with a clear impact on phenotypic susceptibility. This could be a consequence of the limited use of PIs in Mali. However, we observed protease mutations 10I/V and 33F in several subjects (Table 2). Although it is unclear whether these mutations represent resistance mutations or simply polymorphisms in non-B subtypes, their effects in resistance to PIs in subtype B have been well documented [27]. L10I/V was observed in 19 subjects. This mutation is associated with low-level resistance to most PIs except darunavir. Several studies have associated this mutation with the loss of virological response to nelfinavir [27], saquinavir [28], fosamprenavir [29], lopinavir [30], indinavir [31], atazanavir [32] and tipranavir [33]. Moreover, the L10I/V mutation was observed at a higher frequency in Mali (18.81%) than in Burkina Faso (11.7%) [34], which borders Mali. In order to assess whether there could be a founder effect, we performed a phylogenetic analysis which revealed no link between patients harbouring drug resistance mutations (Fig. 2).



L33F was observed in one patient. It has also been recently reported by Derache et al. [7] in Mali. This mutation is associated with low-level resistance to most PIs including lopinavir [35], nelfinavir [36], atazanavir [36, 37] and darunavir [38]. As PIs are not widely used in Mali, these mutations are more likely to be polymorphisms.

We also observed polymorphisms in the C-terminal domain of reverse transcriptase (amino acids 293–560): G335D (prevalence 76.2%; 95% CI 67.9–84.5%), A371V (63.4%; 95% CI 54–72.8%), E399D (10.9%; 95% CI 4.8–17%) and G333D/E (1%; 95% CI 1–1%). Recent studies have shown that these mutations are associated with the emergence of resistance to NRTI and NNRTI drugs. Brehm et al. [39] showed that mutations A371V and Q509L, in association with TAMs, lead to a significant increase in resistance to zidovudine and cross-resistance to lamivudine and abacavir, but not to stavudine or didanosine. G335D, when associated with TAMs, also causes a surge of resistance to zidovudine [40]. E399D has also been associated with resistance to zidovudine and NNRTIs [41]. Recently, Zelina et al. [42] showed that the mutation G333D facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine in combination with M184V. The high prevalence of these mutations observed in our study raises the question of the role of these polymorphisms in non-B subtypes and whether they could contribute to increasing resistance to first-line therapies.

In our study, the overall prevalence of primary resistance in Mali was 9.9% (95% CI 6.9–12.9%). Considering other mutations in the protease gene that could potentially be involved in resistance to PIs, such as 10I/V and 33F, the prevalence would be 28.7% (95% CI 19.9–37.5%). This increase in the rate of primary drug resistance in Mali is worrisome in the context of limited

treatment options for first-line therapy. It is therefore necessary to regularly monitor the development of primary resistance in Mali, and in other resource-limited countries, to better inform our treatment strategies.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CIHR Op # 152243 and by Virco BVBA. CT and VKN are Clinician Scientists supported by the Réseau du Fonds de la Recherche en Sante du Québec (FRSQ) and Réseau FRSQ-SIDA.

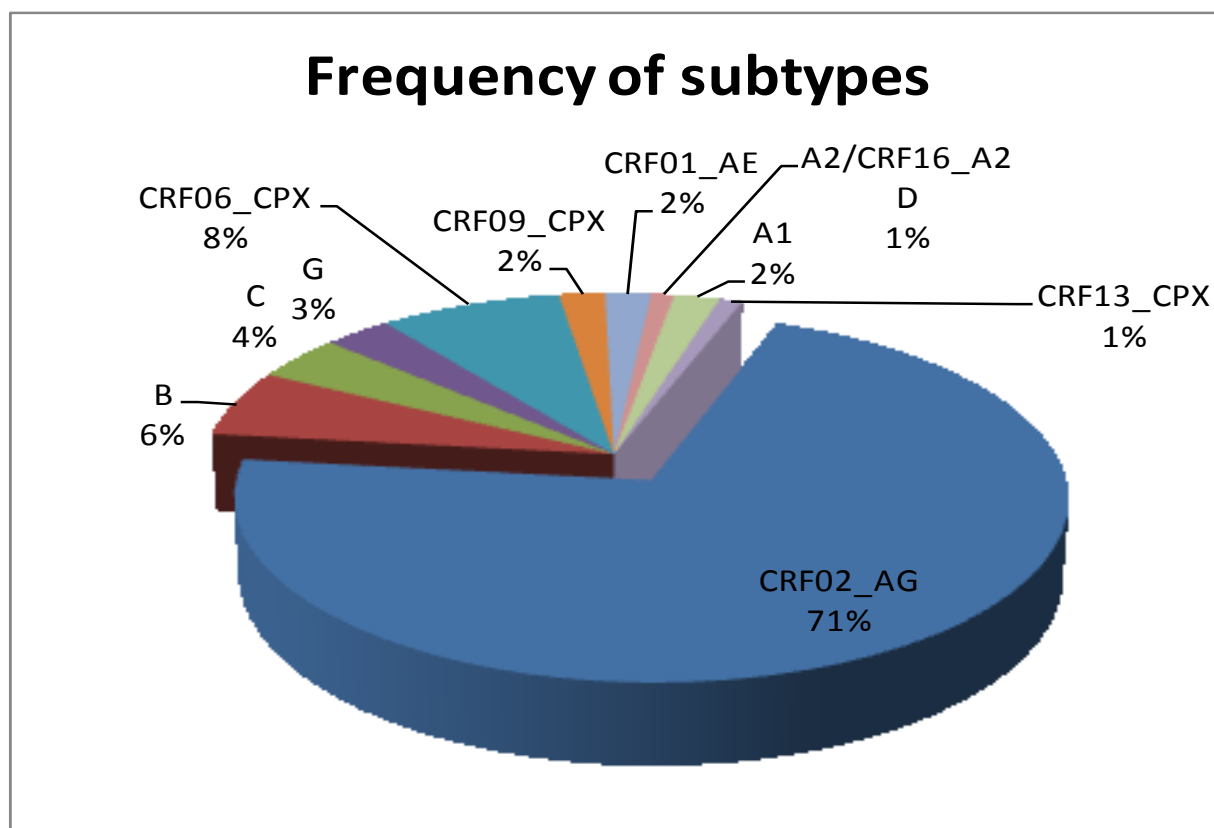
### Tables and figures

Characteristics	Patients
Number	101
Women	76(%)
Men	24(%)
Age	35 (18-65) years
CV	400,000 (225-19,000000) copies/ml
CD4	135 (1-585) cells/mm <sup>3</sup>
CD4<200	67(%)
200-350	21(%)
>350	12(%)

**Table 1:** Characteristics of patients: age, CD4 count and viral load (CV) are expressed in median (inter quartile ranges). Frequency of men versus women is expressed in percentage and calculated using 100 patients.

ID patients	Clades	NRTI mutations	NNRTI mutations	PI mutations
<b>GT2005</b>	G	M41L, T215Y, 184V	K103N	-
<b>GT2013</b>	CRF02_AG	-	K103N	-
<b>GT2021</b>	CRF02_AG	-	-	L10I
<b>GT2027</b>	CRF02_AG	-	V108I	-
<b>GT2030</b>	CRF09_CPX	-	-	L10I
<b>GT2034</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>GT2044</b>	C	K219E	-	-
<b>GT2045</b>	CRF06_CPX	L210W, T215A	-	L10I
<b>CE3001</b>	CRF02_AG	-	-	L10I
<b>CE3002</b>	CRF01_AE	-	-	L10V
<b>CE3003</b>	CRF02_AG	-	-	L10I
<b>CE3006</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>CE3012</b>	CRF02_AG	D67N, K219E	-	-
<b>CE3013</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>CE3015</b>	A1	-	-	L10I
<b>CE3017</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>CE3020</b>	CRF02_AG	-	K103T	-
<b>CE3033</b>	CRF06_CPX	-	-	L10I
<b>CE3037</b>	CRF01_AE	-	-	L33F
<b>CE3049</b>	CRF09_CPX	-	-	L10I
<b>CE3053</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>PG1002</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>PG1003</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>PG1008</b>	CRF02_AG	T215A	-	-
<b>PG1011</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>PG1012</b>	CRF02_AG	-	Y181C	-
<b>PG1013</b>	CRF02_AG	-	V179E	-
<b>PG1019</b>	CRF02_AG	-	-	L10V
<b>PG1021</b>	CRF02_AG	-	-	L10I

**Table 2:** list of mutations observed in this study based on the algorithm Virco. - indicates no mutation. GT (Gabriel Touré), CE (CESAC) PG (Point G) followed by the sample number.



**Figure 1:** Frequency of subtypes for 101 subjects. The determination of subtypes was based on Virco's algorithms.



## References

- 1) Laurent CC, Kouanfack S, Koulla-Shiro N et al. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1 infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet* 2004; 364:29–34.
- 2) Lange JM, Perriens J, Kuritzkes D et al. What policymakers should know about drug resistance and adherence in the context of scaling-up treatment of HIV infection. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3: S69–S74.
- 3) Montes B, Vergne L, Peeters M et al. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35: 329–336.
- 4) Deshpande A, Recordon-Pinson P, Deshmukh R et al. Molecular characterization of HIV type 1 isolates from untreated patients of Mumbai (Bombay), India, and detection of rare resistance mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 1032–1035.
- 5) Turriziani O, Russo G, Lichtner M et al. Study of the genotypic resistant pattern in HIV-infected women and children from rural west Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24: 781–785.
- 6) Politique et protocoles de prise en charge antirétrovirale du VIH/SIDA. Janvier 2006 Ministère de la Santé du Mali, Secrétariat Général et Comité Sectoriel de Lutte contre le SIDA.
- 7) Derache A, Maiga AI, Traore O et al. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 456–463.
- 8) Thompson SD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673–4680.
- 9) Derache A, Traore O, Koita V et al. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir Ther* 2007; 12: 123–129.
- 10) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H et al. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33: 336–342.
- 11) Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA et al. HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 243–251.

- 12) Quan Y, Brenner BG, Marlink RG et al. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 743–753.
- 13) Brenner B, Turner D, Oliveira 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–F5.
- 14) Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D et al. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2159–2165.
- 15) Sylla M, Chamberland A, Boileau C 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.
- 16) WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach. 2003 revision. Geneva: World Health Organization, 2003. Available at [www.who.int/hiv/pub/prev\\_care/en/arvrevision2003en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/arvrevision2003en.pdf) (accessed 7 June 2004).
- 17) Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 2002; 288: 181–188.
- 18) Vergne LM, Peeters E, Mpoudi-Ngole A et al. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in nonsubtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3919–3925.
- 19) Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1047–1056.
- 20) Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI et al. Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Ther* 2008; 21: 13.
- 21) Agwale SM, Zeh C, Paxinos E et al. Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naïve Nigerian patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 22–26.
- 22) Pillay V, Ledwaba J, Hunt G et al. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther* 2008; 13: 101–107.
- 23) Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE et al. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 202–206.



- 24) Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A et al. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Côte d'Ivoire: ANRS 1257 study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 713–717.
- 25) Bonfim I, Sousa B, Lima A et al. Resistance to antiretroviral in drug-naive HIV-1 infected patients in Saõo Tome e Pri'ncipe. In: 4th European HIV Drug Resistance Workshop, Abstract 26 (2006) Monte Carlo.
- 26) Chaix MLD, Descamps M, Harzic V et al. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS* 2003; 17: 2635–2643.
- 27) Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta CF et al. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with PI-based therapy. *J Infect Dis* 2001; 184: 983–991.
- 28) Marcelin AG, Flandre P, de Mendoza C et al. Clinical validation of saquinavir/ritonavir genotypic resistance score in proteaseinhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* 2007; 12: 247–252.
- 29) Marcelin AG, Flandre P, Molina JM et al. Genotypic resistance analysis of the virological response to fosamprenavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients in CONTEXT and TRIAD clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4251–4257.
- 30) Grant PEC, Wong R, Rode R et al. Virologic response to lopinavirritonavir-based antiretroviral regimens in a multicenter international clinical cohort: comparison of genotypic interpretation scores. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4050–4056.
- 31) Para MF, Glidden DV, Coombs RW et al. Baseline human immunodeficiency virus type 1 phenotype, genotype, and RNA response after switching from long-term hard-capsule saquinavir to indinavir or soft-gel-capsule saquinavir in AIDS clinical trials group protocol 333. *J Infect Dis* 2000; 182: 733–743.
- 32) Vora S, Marcelin AG, Gu' nthard HF et al. Swiss HIV cohort study: clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS* 2006; 2: 35–40.
- 33) Baxter JD, Schapiro JM, Boucher CA et al. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol* 2006; 80: 10794–10801.
- 34) Nadembega WM, Giannella S, Simpore J 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.

- 35) King MSR, Rode I, Cohen-Codar V et al. Predictive genotypic algorithm for virologic response to lopinavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3067–3074.
- 36) Rhee SYJ, Taylor G, Wadhera A et al. Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17355–17360.
- 37) Zolopa AW, Towner D, Butcher S et al. Resistance profile after viral rebound on atazanavir-containing therapy: focus on protease inhibitor-naive subjects in the IMPACT study (BMS AI424-128). *HIVDRW2007*.
- 38) Delaugerre CD, Mathez G, Peytavin H et al. Key amprenavir resistance mutations counteract dramatic efficacy of darunavir in highly experienced patients. *AIDS* 2007; 21: 1210–1213.
- 39) Brehm JH, Koontz D, Meter JD et al. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 30-azido-30-dideoxythymidine. *J Virol* 2007; 81: 7852–7859.
- 40) Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S et al. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 2: 317–322.
- 41) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: spring 2008. *Top HIV Med* 2008; 16: 62–68.
- 42) Zelina S, Sheen CW, Radzio J, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 157–163.

## **2.2 Article 2: Voies de résistance aux antirétroviraux et impact de la mutation L10I/V au niveau de la protéase chez le sous type non B.**

Ce travail a fait l'objet d'une soumission dans la revue *Journal of Antivirals & Antiretrovirals* et l'article correspondant est exposé ci-dessous dans sa version soumise.

Numero de soumission: Virology-12-32.

Dans cet article, Alpha Haidara en collaboration avec Annie Chamberland et Mohamed Sylla, a les expériences de mesure de la charge virale, de biologie moléculaire (Extraction d'ARN, PCR et séquençage) et l'analyse phylogénétique des séquences. Alpha Haidara a écrit le manuscrit sous la supervision de sa directrice de recherche Pr Cécile Tremblay.

**Drug resistance pathways and impact of protease mutation L10/V in HIV-1 non-B subtypes**

Alpha Haidara<sup>1</sup>, PharmD, Annie Chamberland<sup>1, 2</sup>, PhD, Mohamed Sylla,<sup>2</sup> MSc, Souleymane Ag Aboubacrine<sup>3</sup>, M.D, Mamadou Cissé<sup>4</sup>, Pr, Hamar A. Traore<sup>3</sup>, Pr, Moussa Y. Maiga<sup>5</sup>, Pr , Anatole Tounkara<sup>3</sup>, Pr, Vinh Kim Nguyen<sup>1</sup>, PhD and Cécile L. Tremblay<sup>1, 2</sup>, M.D, FRCPC. For the ATARAO Group (Appuyer le Traitement Anti Rétroviral en Afrique de l'Ouest)

- (1) Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada,  
(2) Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,  
(3) Hôpital national du Point-G, Bamako, Mali, (4) CÉSAC, Bamako, Mali, (5) Hôpital Gabriel Touré, Bamako, Mali.

“RUNNING HEAD: Drug Resistance, L10I/V impact in CRF02\_AG of HIV-1

## Abstract

### Background

Molecular pathways to drug resistance have yet to be fully characterized in HIV-1 non-B subtypes. Furthermore, polymorphisms such as protease L10I/V are ubiquitous in non-B subtypes, but their biological implications are still unknown. We evaluated resistance pathways emerging at treatment failure in a cohort of HIV-infected individuals in Mali, and characterized in vitro the role of L10I/V.

### Methods

Genotypic resistance testing was performed on plasma obtained from 132 HIV-infected individuals from Mali before and after 9 months of treatment using population sequencing. CRF02\_AG chimeric viruses containing 10I/V mutants CRF02\_AG were constructed using site directed mutagenesis and susceptibility to protease inhibitors (PI) as well as replicative capacity were determined in a PBMC culture assay.

### Results

At treatment initiation, 11/132 (8.3%; 95% CI 3.6-13.0%) patients harboured resistance mutations to NRTI (D67N, T69N, L210W, K219E and T215A) or NNRTI (K103N, V108I and V179E). Among these 11 patients, 5 experienced virological failure after 9 months of treatment. Overall, 18/132 (14.0%; 95% CI 8.1-19.9%) patients failed at 9 months and resistance mutations to NRTI or NNRTI could be identified in 8 (6.10%; 95% CI 2.0-10.2%). NRTI mutation M184V was the most commonly observed, followed by NNRTI mutations Y181C and K103N.

Polymorphisms in protease such as L10I/V were observed frequently. Their role was evaluated in vitro. CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> showed a slight increase in IC<sub>50</sub> for darunavir, lopinavir and nelfinavir compared to subtype B<sub>HXB2\_10L</sub> with 1.2, 1.3 and 1.5 fold-changes (FC) respectively. Mutant's viruses CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> showed a slight increase in IC<sub>50</sub> for indinavir with 1.30 and 1.20 FC and a slight decrease in IC<sub>50</sub> for lopinavir with 0.78 FC and 0.75 FC respectively compared to CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub>. We did not observe any difference in replicative capacity between CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> and HXB2. However, compared to CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub>, mutants, viruses CRF02\_AG<sub>L10I</sub>, and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> showed a significant reduction in replication capacity by 10% ( $p < 0.03$ ) and 12% ( $p < 0.02$ ) respectively. .

## **Conclusion**

Primary resistance to NRTI and NNRTI impacts response to treatment. A common polymorphism in non-B subtypes, L10V, may affect susceptibility of certain PIs.

## Introduction

The availability of antiretroviral (ARV) therapy has brought great hope for people infected with HIV-1 in resource-limited countries. However, the emergence of drug-resistant virus may compromise the effectiveness of treatments in these settings. In our previous study on primary resistance in Mali<sup>1</sup>, we observed a prevalence that exceeds twice the 5% threshold set by the WHO as part of the Resistance Surveillance. Early studies on secondary resistance to ARV in sub-Saharan Africa reported rates of secondary resistance varying between 3.7 to 49% after 24-163 weeks of highly active antiretroviral treatment (HAART)<sup>2</sup>. However, ARVs were developed, tested and validated on HIV-1 subtype B while patients worldwide are mainly infected by non-B subtypes. Otherwise, non-B subtype has several natural polymorphisms in viral genes such as RT and PR and can accumulate many of these polymorphisms known drug resistance mutation in subtype B<sup>3</sup>. Several studies have shown the impact of this diversity on the profiles of resistance mutations to ARVs<sup>4, 5, 6</sup>. We wanted to evaluate whether CRF02\_AG isolates, which are highly prevalent in West Africa, showed a particular pattern of resistance mutations under selective pressure from antiretroviral drugs.

Furthermore, polymorphisms such as protease L10I/V are ubiquitous in non-B subtypes<sup>7, 8, 9</sup>, but their biological implications are still unknown for these subtypes. However, several studies have shown that, in subtype B isolates, mutation 10I/V is involved in the loss of virologic response to most protease inhibitors (PI) except for darunavir<sup>7 and 10-15</sup>. For example, study of Sevin et al has shown in vitro that the mutation at position 10 can increase the IC50 of saquinavir<sup>16</sup>. Perno et al. showed that the simultaneous presence of the mutation 10I/V and M36I is strongly associated with treatment failure in subtype B infected individuals<sup>7</sup>, while 36I is natural present in

CRF02AG. Frequency of L10I/V is increasing in this subtype<sup>1</sup>. However PI-based second-line regimens are likely to be increasingly used in West Africa. Thus, we investigated the impact of 10I/V mutation *in vitro* on resistance to protease inhibitors in the context of CRF02\_AG variants.

## **Method**

### **Study Population**

As part of a cohort of subjects enrolled to receive antiretroviral therapy in Mali, we conducted a study to evaluate the profile of resistance mutations occurring in HIV-1 non-B subtype isolates. A total of 132 patients HIV-infected individuals from Mali were prospectively enrolled in this study between July 2007 and March 2008. Before treatment (T0), we evaluated the presence of resistance mutations by sequencing the *pol* gene and measured the viral load (VL) of all our patients. After 9 months of treatment (T3), we assessed also the presence of resistance mutations in patients who failed. Treatment failure was defined as a viral load > 400 copies/ml.

### **Viral load, viral extraction, PCR and sequencing**

Plasma HIV-1 RNA was measured using Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test version 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, New Jersey, USA). The ultrasensitive method was used with a limit of detection of 25 copies/ ml. Viral RNA from patients with virologic failure were tested for drug resistance. The RNA extraction and the sequencing were performed as described in our previous article<sup>1</sup>. Briefly, Extraction of viral RNA was done using QIAamp spin Mini Kit of QIAGEN (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) according to the protocol provided by Virco. RNA was then amplified using super script III HIFI one step RT-PCR system with HF expand (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturer's protocol and using primers



provided by Virco. Sequencing was performed at Genome Quebec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using eight primers (provided by Virco) covering the PR-RT genes, a total length of approximately 1600 pb with 1-99 aa for PR and 1-440 aa.

### **Site Directed mutagenesis on plasmid CRF02\_AG**

CRF02\_AG plasmid (p97GH-AG2) was kindly provided by Prof. Mark A. Wainberg (Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University AIDS Centre). This plasmid already contained a valine (CRF02\_AG<sub>L10V</sub>) at position 10 (V) instead of leucine (L). We first mutated the valine (V) with leucine (L) to obtain the wild type isolate (CRF02\_AG<sub>10L</sub>) and then we mutated L to isoleucine (I) to obtain our second mutant (CRF02\_AG<sub>L10I</sub>). We used the Quick Change XL 10 Gold from Stratagene. We followed the manufacturer's protocol for the construction of primers and PCR. The primers used for mutation 10I were: 5'-CTCT TTGGCAACGACCAATAGTCGCAGTAAGAG-3' and antisense 3'-GAGAAACCGTTGCTGG TTATCAGCGTCATTCTC-5'. For the 10L, the primers used were: 5'-CTCTTTGGCAACGAC CATTAGTCGCAGTAAGAG-3' and antisense 3'-GAGAAACCGTTGCTGGTAATCAGCGTC ATTCTC-5'. After mutagenesis, the protease gene was cut for each mutant (10L and 10I) with BSTB1 (20,000 units/ml, Biolab New England) and EcoRI (100,000 units/ml, Biolab New England). Finally, we used T4 DNA ligase (2,000,000 cohesive end units/ml, Biolab New England) to insert the mutants' protease into the plasmid previously cleared of its original protease. Before insertion, all mutations were confirmed by sequencing the gene *pol* with primers covering this region and provided by Virco. Moreover, a subtype B reference HXB2 was introduced as a control.

### **Viral Production**

The viruses were produced by transfection of 293T cells with 10µg of plasmid using FuGENE6<sup>17</sup>. After 48 hours, supernatants were harvested and the p24 antigen was measured by ELISA (HIV-1 P24 Antigen ELISA test kit-192, Perkin Elmer, USA) following the manufacturer's instruction to determine viral replication. The infectivity of virus produced was determined on CD4+CCR5+CXCR4+ MAGI cells (kindly provided by Dr. Ancuta's lab, CRCHUM, Montreal, Canada). Viruses recovered from the supernatants were titrated in PBMCs using limiting dilution culture method. After 5 days, the titer was measured as the rate of 50% tissue culture infectious doses (TCID50/ml) and calculated using the method of Reed & Muench<sup>18</sup>.

### **Protease inhibitors**

All PI used in our experiments were kindly provided by the National Institutes of Health (NIH): amprenavir (APV), atazanavir (ATZ), darunavir (DRV), indinavir (IDV), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV) and saquinavir (SQV). The compounds were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mM and stored at -20 ° C until use.

### **Determination of IC50 and replication capacity**

IC50 determination and evaluation of replicative capacity were conducted as previously described<sup>19</sup>. Briefly, activated with phytohaemagglutinin (PHA) for 3 days were infected with various viruses (1000 TCID50/ml per 10<sup>6</sup> cells). Viruses were preincubated with the cells for 2 hours. The drugs were added simultaneously and cells were suspended in 24-well plates in a final volume of 1.0 ml of R-20 medium supplemented with 10% interleukin-2. The cells were then

placed in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37° C. We conducted two experiments and each experiment was performed in duplicate. For each experiment, the culture medium was changed twice weekly. In addition, a toxicity control was maintained with uninfected cells treated with a maximum concentration for each drug. Viruses without cells or drugs were also maintained in culture throughout the experiments to take into account the viral carryover. Five different drug concentrations were used for each compound. Thus, for APV, concentrations ranges varied from 0.005 to 0.08µM, ATZ 0.0017 to 0.028µM, DRV 0.001 to 0.016µM, IDV 0.003 to 0.052, LPV 0.007 to 0.12µM, NFV 0.00075 to 0.012µM and SQV 0.0025 to 0.04µM. After 7 days, the culture supernatant was harvested for determination of virus replication as measured by p24 antigen ELISA (HIV-1 P24 Antigen ELISA Test Kit-192 Perkin Elmer USA). Cell proliferation and viability were assessed by Trypan blue exclusion method. The inhibitory concentrations 50% and 90% (IC<sub>50</sub>, IC<sub>90</sub>) of each PI were determined by the dose-response analysis using the program CalcuSyn for Windows software by T.-C. Chou & M. Hayball (Biosoft, Cambridge, United Kingdom)<sup>20</sup>. Replicative capacity was determined by measuring the production of p24 by ELISA (HIV-1 P24 Antigen ELISA Test Kit-192 Perkin Elmer USA).

### **Data Analysis**

Viral sequences were analyzed using Sequencer 4.5 software Gene Code Corporation, Ann Arbor, MI. Determination of subtypes and the analysis of resistance mutations were performed using the Virco algorithm (Virco BVBA, VircoNET2, Belgium). Statistical analysis was performed using the statistical package Statistical Analysis System (SAS) version 9.1. Treatment failure or not to antiretroviral (ARV), resistance and 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were considered variables of interest. Treatment failure was defined as a viral load (VL) greater than

400 copies / ml. Resistance was determined by the presence of at least one resistance mutation to any class of drugs: Nucleoside of Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI); Non Nucleoside of Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI); PI according to the Virco's algorithm and verified by the list of mutations established by the World Health Organization (WHO) and the International AIDS Society-USA and Stanford HIV drug resistance database. The IC<sub>50</sub> was determined by the dose-response analysis using the program CalcuSyn for Windows software by T.-C. Chou & M. Hayball (Biosoft, Cambridge, United Kingdom). Mutant's viruses were compared to the wild type CRF02\_AG to assess the impact of these mutations on resistance to PIs tested. A subtype B reference HXB2 was introduced in order to compare the sensitivity of PI between subtype B and non-B. Fold change (FC) was determined for each PI in mutant's viruses compared to wild-type. The student t-test was used to compare means of IC<sub>50</sub>. P value <0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

### **Study population and treatment regimen**

132 patients were enrolled in this study between July 2007 and March 2008. The characteristics of patients at baseline are shown in table.1. After 9 months of treatment, 78 patients (59.0%; 95% CI 50.6-67.4%) had viral loads < 25 copies / ml, 36 (27.0%; 95% CI 19.4-34.6%) had 25-400 copies / ml and 18 (14.0% ; 95% CI 8.1-19.9%) had a VL> 400 copies/ml. 87.0% (95% CI 81.3-92.7%) of patients were on a stavudine (d4T) + lamivudine (3TC) + nevirapine (NVP) regimen (**table.1**).

### **Evolution of drug resistance mutation and treatment failure**

Before treatment initiation, 11/132 patients (8.3%; 95% CI 3.6-13.0) had primary resistance mutations to either nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Among these 11 patients, 5 patients failed treatment at T3: sample from one patient with initial K103N could not be sequenced at failure, one other with initial T69N had no resistance mutation at failure, and the other 3 with initial V108I, V179E and D67N+K219E respectively failed with the same mutations. Only one patient acquired additional mutations (V108I at baseline + M184V and K101E at failure). The others 6/11 patients were virologically suppressed at T3 despite the presence of mutations at list one TAM mutations: L210W, K219E and T215A. Other 13 patients without mutation at baseline were failed at T3. Among these patients, samples from 4 patients could not be sequenced because of the poor sample quality. 4 had no mutation and others 5 were multi-resistant with NRTI an NNRTI mutation (**table.2**).

Overall, 18/132 patients (14.0%; 95% CI 8.1-19.9%) failed at 9 months and resistance mutations to NRTI or NNRTI were identified in 8 (6.10%; 95% CI 2.0-10.2%): the 5 multi-resistant patients and the 3 patients who failed with their baseline mutation. M184V was the most commonly observed NRTI resistance mutations in 6/8 (75%) patients. For NNRTI, Y181C was observed in 3/8 (37%) patients followed by K103N observed in 2/8 (25%). No mutation TAM was selected by the treatment (**table.2**).

Currently, several studies done with subtype B isolates have shown the importance of polymorphisms in the connection domain of the reverse transcriptase on drug sensitivity. It was

recently found that these mutations are associated to NRTI and NNRTI resistance<sup>21-25</sup>. Notably, it has been shown that the combination of Thymidine-Associated Mutations (TAM) or M184V with some mutations in the connection domain such as G333D/E, G335D, A371V and Q509L contributed significantly to dual AZT-lamivudine (3TC) resistance as well as other NRTI<sup>22, 25</sup>. We observed several connection domain mutations present at T0: G335D was present in 83.3% (95% CI 76.9-89.7%) and A371V in 53.8% (95% CI 45.3-62.3%). Among patients who failed, 6 had mutations G335D or G335D+A371V in the connection domain at baseline. None of these patients had showed an association of these mutations with M184V or TAM at failure. Moreover, 3/6 patients failed with only M184V (**table.2**).

No major PI mutations were observed. However, the polymorphisms 10I/V were observed in 22/132 patients (16.7%; 95% CI 10.3-23.1%) at T0.

### **In vitro susceptibility of CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub>**

First, the susceptibility of wild type CRF02\_AG<sub>10L</sub> was compared to subtype B HXB2<sub>10L</sub> against several protease inhibitors. No changes were observed for AMP and ATZ. CRF02\_AG<sub>10L</sub> IC<sub>50</sub> for DRV, LPV, and NFV were slightly increased compared to subtype B HXB2<sub>10L</sub> with 1.2, 1.3 and 1.5 fold change respectively, and slightly decreased for IDV 0.71 FC (**table.3**). Mutant viruses, CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> were constructed using site-directed mutagenesis, and IC<sub>50</sub>s to protease inhibitors were compared to wild type CRF02\_AG<sub>10L</sub>. Very little difference was observed in overall IC<sub>50</sub> of the mutant CRF02\_AG<sub>L10I</sub> vs wild-type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub>, except for a slight increase of IC<sub>50</sub> for indinavir 0.0175 $\mu$ M $\pm$ 0.0092 versus 0.0134 $\mu$ M $\pm$ 0.0035 (FC 1.3) and a slight decrease in IC<sub>50</sub> for LPV of 0.0230  $\mu$ M $\pm$ 0.0050 versus

0.0292 $\mu$ M $\pm$ 0.0030 (FC 0.78). Similar results were observed for mutant virus CRF02\_AGL10V, with an increase in IC50 for IDV of 0.0156 $\mu$ M $\pm$ 0.0074 versus 0.0134 $\mu$ M $\pm$ 0.0035 compared to wild type CRF02AG<sub>wt\_10L</sub> with 1.2 FC and a decrease in IC50 for LPV of 0.0220  $\mu$ M $\pm$ 0.0024 (FC 0.75) (*table.4*).

### **Replicative capacity**

There was no difference in replicative capacity between our reference strain HXB2 and wild-type CRF02\_AG<sub>10L</sub>. On the other hand, compared to wild type CRF02\_AG<sub>10L</sub>, the two mutants CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> showed a significant reduction in replicative capacity by 10% (p<0.03) and 12% (p<0.02) respectively (**figure.1**).

### **Discussion**

In our study, we observed 11 patients with resistance mutations before treatment initiation, and 5 of these experienced treatment failure after 9 months of treatment. This highlights the impact of transmitted drug resistance on treatment outcomes. Of the other 6 patients with each one TAM mutation: L210W, T215A and K219E were not failure at T3 (CV < 400) (*table.2*). Recently, Germaud et al. have made the same observation with other TAM mutations such as D67N and K70R in patients under treatment for 6 months<sup>26</sup>. This result could indicate that a single mutation TAM is not sufficient to lead a resistance in the non B subtype viruses. However, 3 of these patients had not fully suppressed their viral load (range 124-324 copies / ml) and one had a VL of 68 copies /ml. Thus, longer follow-up will tell whether this partial suppression is sustained, as these individuals are at risk for long-term treatment failure. This evaluation was done using population sequencing which underestimates minority variants. A recent study has shown that

variants present under the level of detection of population sequencing unfavorably impact treatment outcomes<sup>27</sup>.

Among our 13 patients without mutations at baseline, 4 patients failed without any drug resistance mutation at T3. This could reflect issues related to treatment adherence. In Mali as in many countries in West Africa, shortage of supplies including ARV medications often becomes an added burden to treatment adherence which is already complicated by social instability, fear of disclosure and tolerability issues. However, the small number of failure indicates that these burdens can be overcome. The others 5 have selected NRTI and NNRTI mutations. But, these mutations were compatible with the treatments used.

At time T3, we observed 8 patients or 6.10% (95% CI 2.0-10.2%) with at least one resistance mutation to one class of ARVs used in this country. This result is similar to a study conducted in Tanzania that showed a rate of drug resistance mutations of 3.9% after 1 year of treatment<sup>28</sup>. However, another study shows that in other West African countries, the prevalence of secondary resistance mutations is higher: with 14.2% in Ivory Coast after 1 year<sup>29</sup> and 12.5% in Senegal<sup>30</sup>. These results show variability in the prevalence of resistance mutations in Africa<sup>28</sup>.

Among these 8 patients, M184V (75.0%) selected by 3TC was the most frequent for NRTI. Y181C (37.5%) was the most common NNRTI mutation observed followed by K103N (25%). All these mutations were consistent with the regimens used in this country and with the pattern of drug resistance mutations observed at treatment failure in Africa. For example, a study in Burkina Faso showed that M184V was present in patients failing therapy at a rate of 57.3%<sup>31</sup>,



64% in Tanzania<sup>28</sup>, up to 75% in Ivory Coast<sup>29</sup> and 86 % in Uganda<sup>32</sup>. This is related to the presence of lamivudine in the first line regimens of most of these countries. In our study, Y181C was more prevalent than K103N (23.08% vs. 15.38%) unlike other studies in Africa where K103N was observed more frequently. For example, a study in Burkina Faso shows 44.4% and 16%<sup>31</sup>, Tchad 47% and 35%<sup>33</sup> and up to 95% and 2% in Ivory Coast<sup>29</sup>, for the K103N and Y181C respectively. This could be related to the use of NVP in most of our patients as opposed to efavirenz which may have been more broadly used in these studies. In addition, thymidine analogue mutations (TAM) mutations were not selected in our study. This could be due to rapid selection of the M184V by lamivudine increasing the sensitivity of D4T, thereby delaying the emergence of TAMs<sup>34</sup>.

We observed polymorphisms or mutations in the connection domain in of our patients who failed treatment. The presence of polymorphisms or mutations in the connection domain of the reverse transcriptase can affect treatment response in subtype B in combination with TAM or M184V<sup>21-25</sup>. It has been clearly demonstrated that an association of the mutation A371V with certain TAM2 mutations (D67N, K70R) result in high-level resistance to AZT and low-level resistance to 3TC, ABC and TDF in subtype B isolates<sup>21, 24</sup>. In addition, several studies have shown that a combination of the G335D with M184V or TAM significantly contributes to AZT and 3TC dual resistance in subtype B<sup>22, 25</sup>. However, few studies have examined the impact of mutations in the connection domain mutations (G335D, A371V) on drug resistance in non-B subtype isolates. Moreover, a recent study has shown that mutations G335D and A371V alone do not cause resistance irrespective of subtypes, and act as simple polymorphisms in patients naive. But when these mutations are associated with M184V, they lead to high-level resistance to AZT<sup>23</sup>. In our

study, we observed that none of the 6 failing patients harbouring the G335D mutation at baseline had developed an association with M184V at failure. This observation speaks against an important clinical role of G335D in emergence of drug resistance in CRFAG\_02 subtype. Moreover, 3 of these 6 patients failed at T3 with only M184V (**table.2**). One hypothesis would be that the presence of the G335D mutation prior to treatment initiation would prevent its association with M184V in non-B subtypes.

The L10I/V mutation has been associated to a loss of virologic response to most PI except darunavir in several studies involving subtype B isolates. First, Sevin et al. has shown in vitro that the mutation at position 10 increases 2.86-fold in IC50 of saquinavir<sup>16</sup>. A study of Para in 2000 showed that the presence of a substitution or a combination of substitutions at codons 10, 20, 48, 82, 84 or 90 was significantly associated with attenuated response to treatment with IDV and similarly at codons 10, 73, and 84 for SQV<sup>14</sup>. Marcelin et al. identified 12 positions in the protease gene including L10 involved in the reduction of the virological response to SQV in a study of 138 patients on protease inhibitors<sup>13</sup>. In another study, the same group showed that L10I/V was among 14 protease mutations involved in the reduction of the virological response to fosamprenavir<sup>12</sup>. L10V was also associated with reduced phenotypic susceptibility and virologic response to TPV<sup>10</sup>. Vora et al. study in 2006 et al identified 8 positions in the protease gene including L10I/V/F in the genotypic resistance to atazanavir in a study of 62 patients on protease inhibitor<sup>15</sup>. Furthermore, in 2007, study of Cesar et al of 191 patients treated with nelfinavir or lopinavir showed that the mutation L10I was strongly associated with treatment failure<sup>35</sup>.

In non-B subtype, L10I/V polymorphisms are very prevalent. However their role in drug resistance in non-B subtypes has not been well studied. In our study, 16.7% (95% CI 10.3-23.1%) of our patients harboured these polymorphisms at baseline although they had never been exposed to PIs. However PI-based second-line regimens are likely to be increasingly used in West Africa. Therefore, it is important to have reliable data on the impact of these natural mutations on CRF02\_AG susceptibility to PIs. In this study, wild-type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> seems to exhibit slightly higher IC<sub>50</sub> to DRV, LPV and NFV (1.2, 1.3 and 1.5 FC) respectively compared to subtype B<sub>HXB2\_10L</sub>. However these changes do not seem to be clinically significant as they are within the biological cut-offs defined by most algorithms. Of note, LPV FC was close to its biological cut-off (1.6). Our mutant virus CRF02\_AG<sub>L10I</sub> show a slight increase in IC<sub>50</sub> against indinavir compared to wild type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> with a 1.3 FC fold change. Although this is a minor increase, it could contribute to decreased susceptibility if associated with other PI mutations. This was also true for CRF02\_AG<sub>L10V</sub>, with 1.2 FC. Of note, our mutants displayed hypersensitivity to lopinavir (10I 0.78 and 10V 0.75). This observation would show that the mutation at position 10 may increase the sensitivity of lopinavir in CRF02\_AG subtype. However, the clinical significance of this has yet to be determined.

M36I has been shown to decrease CRF02\_AG isolates susceptibility to SQV<sup>36</sup>. This mutation is a natural polymorphism occurring in 99-100% of non-B subtype<sup>1, 37</sup> and was present in our strain CRF02\_AG. However, we did not observe this decreased susceptibility to SQV which might suggest that other mutations in the protease may compensate this effect of M36I.

Resistance interpretation algorithms are mostly based on subtype B<sup>38</sup>. A 2010 study of Yebra et al comparing 354 naïve patients with 128 non-B and 226 B subtypes has shown that genotypic drug resistance interpretation algorithms devised for viruses belonging to subtype B, displayed high level of discordance when applied to non-B strains from HIV-1<sup>39</sup>. However, differential pathways of drug resistance have been described in non-B subtypes. Therefore it is important to continue to characterize the impact of natural polymorphisms as they are the main reason for discordant interpretations amongst algorithms<sup>40</sup>.

Finally, we assessed the replicative capacity of our different strains. Wild type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> and subtype B<sub>HXB2\_10L</sub> was similar. On the other hand, both mutants CRF02\_AG<sub>L10I</sub>, CRF02\_AG<sub>L10V</sub> showed a significant reduction in replication capacity compared to wild type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub>. This reduction is of small magnitude. However it could explain why L10I/V is not as prevalent as M36I which is ubiquitous in non-B subtypes and has been shown to increase replication, mostly in G and A subtypes<sup>41</sup>.

## Conclusion

As with other cohort studies on antiretroviral treatment in this sub-region of West Africa such as Ivory Coast<sup>29</sup>, Senegal<sup>30</sup> or Tchad<sup>33</sup>; we observed a good response to treatment. Pathways of resistance leading to treatment failure in our cohort seem to be similar to those observed with subtype B: M184V, K103N and Y181C. The presence of a single TAM mutation such as L210W, T215A and K219E may not affect the first line treatment in CRF02\_AG. Mutations in the connection domain are frequently observed in non-B subtype and did not seem to play a major role in treatment failure in our study. Whether the presence of the G335D mutation prior

to initiation of treatment would prevent the association of this mutation with the M184V mutation among non-B subtypes remains to be evaluated. L10I/V polymorphisms on their own have limited impact on in vitro susceptibility to protease inhibitors in CRF02\_AG isolates. Their impact in association with other PI mutations is still unknown.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CIHR Op # 152243 and by Virco BVBA. CT and VKN are Clinician Scientists from the Réseau du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Réseau FRSQ-SIDA.

## Tables and figures

**Table.1:** Characteristics of study's patients at baseline (T0).

Characteristics	Patients
Number	132
Women	67.42%
Men	32.58%
Age	35 (20-65) years
CD4	188.5 (2-585) cell/mm <sup>3</sup>
Viral load (VL)	217,000 (45-3,200,000) copies/ml
D4T +3TC + NVP	87% (95% CI 81.3-92.7%)
AZT+3TC+EFV	4% (95% CI 0.7-7.7%)
AZT+3TC+IDV	4% (95% CI 0.7-7.7%)
D4T+3TC+EFV	3% (95% CI 0.1-5.9%)
D4T+3TC+IDV/rt	1% (95% CI 0-2.7%)
AZT+3TC+NVP	1% (95% CI 0-2.7%)

Age, CD4 count and viral load (VL) are expressed in median (inter quartile ranges). Frequency of men versus women is expressed in percentage. Proportion of regimen is shown with confidence interval 95% (95% CI).

**Table.2: Patients with drug resistance mutations at baseline (T0) and after 9 months of treatment (T3)**

Baseline (T0)					After 9 month of treatment (T3)		
ID	Subtypes	NRTI	NNRTI	PI	NRTI	NNRTI	PI
<i>Patients with baseline drug resistance mutations who did not fail</i>							
GT2026	CRF02_AG	K219E	0	0	-	-	-
GT2035	CRF13_CPX	L210W	0	0	-	-	-
GT2042	CRF06_CPX	T215A	0	0	-	-	-
GT2044	C	K219E	0	0	-	-	-
GT2045	CRF06_CPX	L210W	0	L10I	-	-	-
PG1005	CRF02_AG	T215A	0	0	-	-	-
<i>Patients with baseline drug resistance mutations who failed</i>							
GT2052	CRF02_AG	0	V108I	0	G335D, M184V	K101E, V108I, G190A	0
CE3008	CRF02_AG	0	K103N	0	ND	ND	ND
CE3012	CRF02_AG	D67N, K219E	0	0	D67N, K219E	0	0
CE3027	CRF06_CPX	G335D	V179E	0	0	V179E	0
CE 129	CRF02_AG	G335D, A371V, T69N	0	0	G335D		L10V
<i>Patients without baseline drug resistance mutations who failed</i>							
GT2014	CRF02_AG	0	0	0	0	0	0
GT2018	CRF02_AG	0	0	0	0	0	0
GT2038	A1	G335D, A371V	0	0	0	0	0
CE3049	CRF09_CPX	0	0	L10I	G335D, A371V	0	L10I
CE3080	CRF02_AG	G335D	0	0	M184V	K103N	0
CE3094	CRF02_AG	0	0	L90I, L10V	G335D, A371V, M184V	Y181C	L90I
CE3128	CRF02_AG	G335DA371V	0	L10V	M184V	K101Q, K103N	L10V
CE3131	CRF02_AG	G335D	0	L10V	M184V	Y181C	L10V
GT2043	CRF02_AG	0	0	0	M184V	Y181C	L10V
GT2001	CRF02_AG	0	0	0	ND	ND	ND
GT2009	CRF02_AG	0	0	0	ND	ND	ND
CE3003	CRF02_AG	0	0	L10I	ND	ND	ND
PG1019	CRF02_AG	0	0	L10V	ND	ND	ND

Genotypes and mutations were determined with Virco's algorithm. ND: not determined.

**Table.3: IC50 ( $\mu$ M) and their fold change wild type CRF02\_AGwt\_L10 VS subtype****B<sub>HXB2\_10L</sub>.**

Drugs	Amprenavir (2.2)		Atazanavir (2.1)		Darunavir (2)		Indinavir (2.3)		Lopinavir (1.6)		Nelfinavir (2.2)		Saquinavir (1.8)	
Clones	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC
CRF02_AG <sub>WT 10L</sub>	0.0199 ± 0.0014	0.95	0.0072 ± 0.0009	0.96	0.0039 ± 0.0005	1.2	0.0134 ± 0.0035	0.71	0.0292 ± 0.0030	1.3	0.0147 ± 0.0060	1.5	0.011 ± 0.0007	1.1
HXB2	0.02100 ± 0.0008	-	0.0075 ± 0.0005	-	0.0031 ± 0.0001	-	0.0188 ± 0.0015	-	0.0223 ± 0.0032	-	0.0097 ± 0.0022	-	0.0098 ± 0.0004	-

IC50 values represent the average of two experiments in duplicate. For each drugs, five different concentrations were used. Susceptibility of drugs has been determined by the fold change of IC50 (FC) and calculated as the IC50 ratio CRF02\_AG<sub>WT 10L</sub>/HXB2. The FC in parenthesis is the biological cut-off for each PI by Antivirogram-Virco. HXB2 is reference of subtype B virus.

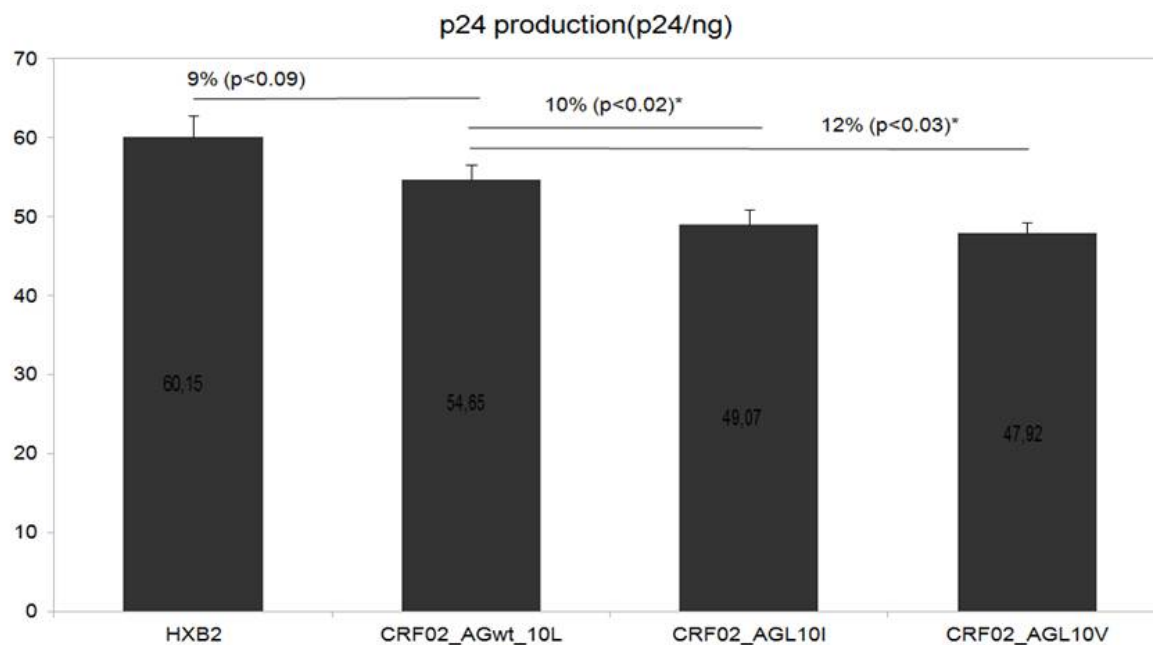


**Table.4: IC50 ( $\mu\text{M}$ ) and their fold change mutants (CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub>) VS wild type CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub>.**

Clones	Amprenavir (2.2)		Atazanavir (2.1)		Darunavir (2)		Indinavir (2.3)		Lopinavir (1.6)		Nelfinavir (2.2)		Saquinavir (1.8)	
	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC	IC50	FC
CRF02_AG <sub>L10I</sub>	0.0184 ± 0.0017	0.92	0.0068 ± 0.0004	0.94	0.0043 ± 0.0002	1.10	0.0175 ± 0.0092	<b>1.30</b>	0.0230 ± 0.0050	<b>0.78</b>	0.0123 ± 0.0050	0.83	0.0106 ± 0.0006	0.96
CRF02_AG <sub>L10V</sub>	0.0177 ± 0.0004	0.89	0.0069 ± 0.0004	0.96	0.0036 ± 0.0003	0.92	0.0156 ± 0.0074	<b>1.20</b>	0.0220 ± 0.0024	<b>0.75</b>	0.0131 ± 0.0070	0.89	0.0102 ± 0.0007	0.93
CRF02_AG <sub>WT_10L</sub>	0.0199 ± 0.0014	-	0.0072 ± 0.0009	-	0.0039 ± 0.0005	-	0.0134 ± 0.0035	-	0.0292 ± 0.0030	-	0.0147 ± 0.0060	-	0.011 ± 0.0007	-

IC50 values represent the average of two experiments in duplicate. For each drugs, five different concentrations were used. Susceptibility of drugs has been determined by the fold change of IC50 (FC) and calculated as the IC50 ratio CRF02\_AG<sub>L10I</sub>/CRF02\_AG<sub>WT\_10L</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> / CRF02\_AG<sub>WT\_10L</sub>. The FC in parenthesis is the biological cut-off for each PI by Antivirogram-Virco. The FC in parenthesis is the biological cut-off for each PI by Antivirogram-Virco.

**Figure.1: Capacity replication based on the measure of P24 production**



p24 measured by ELISA on the supernatant of PBMCs after 7 days of culture. The Result is for 2 experiments at duplicate. PBMCs Were Infected With TCID<sub>50</sub>/ml 1000 per 10<sup>6</sup> cells. CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> is Wild type. CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> are mutants. HXB2 is the subtype B reference. % values are the p24 reduction between HXB2 and CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> on the one hand, and CRF02\_AG<sub>wt\_10L</sub> and the 2 mutants CRF02\_AG<sub>L10I</sub> and CRF02\_AG<sub>L10V</sub> on the other hand. The student t-test (bilateral) was used to compare the average. **p<0.05** was considered statistically significant. \* indicated statistically significant p-value.

## References

1. Haidara A, Chamberland A, Sylla M, Aboubacrine SA, Cissé M, Traore HA, Maiga MY, Tounkara A, Nguyen VK and Tremblay C; Appuyer le Traitement Anti Rétroviral en Afrique de l'Ouest (ATARAO) Group 1. 2010. High level of primary drug resistance in Mali. *HIV Med.* 11:404-11.
2. Hamers RL, Derdelinckx I, van Vugt M, Stevens W, Rinke de Wit TF and Schuurman R; PharmAccess African Studies to Evaluate Resistance Programme. 2008. The status of HIV-1 resistance to antiretroviral drugs in sub-Saharan Africa. *Antivir Ther.* 13:625-39.
3. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Pillay C, Rudich H, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brigido LF, Grossman Z, Vandamme AM, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW. 2005. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* 2:e112.
4. Martinez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB and Wainberg MA. 2009. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). *J Int AIDS Soc.* 12(1):11
5. Quan Y, Brenner BG, Marlink RG, Essex M, Kurimura T and Wainberg MA. 2003. Drug resistance profiles of recombinant reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 subtypes A/E, B, and C. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19:743-53.
6. Sylla M, Chamberland A, Boileau C, Traoré HA, Ag-Aboubacrine S, Cissé M, Koala S, Drabo J, Diallo I, Niamba P, Tremblay-Sher D, Machouf N, Rashed S, Nickle DC, Nguyen VK and Tremblay CL; ATARAO Group. 2008. Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02\_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. *Antivir Ther.* 13:141-8.
7. Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Forbici F, Violin M, Bertoli A, Facchi G, Pezzotti P, Cadeo G, Tositti G, Pasquinucci S, Pauluzzi S, Scalzini A, Salassa B, Vincenti A, Phillips AN, Dianzani F, Appice A, Angarano G, Monno L, Ippolito G, Moroni M and d'Arminio Monforte A; Italian Cohort Naive Antiretroviral (I.CO.N.A.) Study Group. 2001. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis.* 184:983-91.
8. Velazquez-Campoy A, Todd MJ, Vega S and Freire E. 2001. Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from African viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6062-7.
9. Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, Mboup S, Mulanga-Kabeya C, Saman E, Jourdan J, Reynes J and Delaporte E. 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus

type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol.* 38:3919-25.

10. Baxter JD, Schapiro JM, Boucher CA, Kohlbrenner VM, Hall DB, Scherer JR and Mayers DL. 2006. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Viro.* 1:10794-801.

11. Grant P, Wong EC, Rode R, Shafer R, De Luca A, Nadler J, Hawkins T, Cohen C, Harrington R, Kempf D and Zolopa A. 2008. Virologic response to lopinavir-ritonavir-based antiretroviral regimens in a multicenter international clinical cohort: comparison of genotypic interpretation scores. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4050-6.

12. Marcelin AG, Flandre P, Molina JM, Katlama C, Yeni P, Raffi F, Antoun Z, Ait-Khaled M and Calvez V. 2008. Genotypic resistance analysis of the virological response to fosamprenavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients in CONTEXT and TRIAD clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4251-7.

13. Marcelin AG, Flandre P, de Mendoza C, Roquebert B, Peytavin G, Valer L, Wirden M, Abbas S, Katlama C, Soriano V and Calvez V. 2007. Clinical validation of saquinavir/ritonavir genotypic resistance score in protease-inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther.* 12:247-52.

14. Para MF, Glidden DV, Coombs RW, Collier AC, Condra JH, Craig C, Bassett R, Leavitt R, Snyder S, McAuliffe V and Boucher C. 2000. Baseline human immunodeficiency virus type 1 phenotype, genotype, and RNA response after switching from long-term hard-capsule saquinavir to indinavir or soft-gel-capsule saquinavir in AIDS clinical trials group protocol 333. *J Infect Dis.* 182:733-43.

15. Vora S, Marcelin AG, Günthard HF, Flandre P, Hirsch HH, Masquelier B, Zinkernagel A, Peytavin G, Calvez V, Perrin L and Yerly S; Swiss HIV Cohort Study. 2006. Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS.* 20:35-40.

16. Sevin AD, DeGruttola V, Nijhuis M, Schapiro JM, Foulkes AS, Para MF, Boucher CA. Methods for investigation of the relationship between drug-susceptibility phenotype and human immunodeficiency virus type 1 genotype with applications to AIDS clinical trials group 333. *J Infect Dis.* 2000 182:59-67.

17. Ancuta P, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D and Gabuzda D. 2006. CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. *J Immunol.* 176:5760-71.

18. Dulbecco, R. 1998. Endpoint methods-measurements of the infectious titer of a viral sample. In *Virology* (Dulbecco, R. & Ginsberg, H. S., Eds), pp. 22-5. J. P. Lippincott, Philadelphia, PA, USA.

19. Bulgheroni E, Citterio P, Croce F, Lo Cicero M, Viganò O, Soster F, Chou TC, Galli M and Rusconi S. 2004. Analysis of protease inhibitor combinations in vitro: activity of lopinavir, amprenavir and tipranavir against HIV type 1 wild-type and drug-resistant isolates. *J Antimicrob Chemother.* 53:464-8
20. Chou TC and Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 22:27-55.
21. Brehm JH, Koontz D, Meterer JD, Pathak V, Sluis-Cremer N and Mellors JW. 2007. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *J Virol.* 81:7852-9.
22. Gallego O, Corral A, de Mendoza C, Rodés B and Soriano V. 2002. Prevalence of G333D/E in naive and pretreated HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 18:857-60.
23. Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. 2009. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* 82:115-21
24. Santos AF, Lengruber RB, Soares EA, Jere A, Sprinz E, Martinez AM, Silveira J, Sion FS, Pathak VK, Soares MA. 2008. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One.* 3:e1781.
25. Zelina S, Sheen CW, Radzio J, Mellors JW and Sluis-Cremer N. 2008. Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 Reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:157-63.
26. Germanaud D, Derache A, Traore M, Madec Y, Toure S, Dicko F, Coulibaly H, Traore M, Sylla M, Calvez V, Marcelin AG. 2010. Level of viral load and antiretroviral resistance after 6 months of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor first-line treatment in HIV-1-infected children in Mali. *J Antimicrob Chemother.* 65:118-24.
27. Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, Wantman M, Hammer SM, Palmer S, Vaida F, Coffin JM, Mellors JW. 2010. Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment- experienced patients. *J Infect Dis.* 201:672-80.
28. Johannessen A, Naman E, Kivuyo SL, Kasubi MJ, Holberg-Petersen M, Matee MI, Gundersen SG and Bruun JN. 2009. Virological efficacy and emergence of drug resistance in adults on antiretroviral treatment in rural Tanzania. *BMC Infect Dis.* 9:108-116.
29. Hanson DL, Adjé-Touré C, Talla-Nzussouo N, Eby P, Borget MY, Kouadio LY, Celestin BE, Tossou O, Eholie S, Kadio A, Chorba T and Nkengasong JN. 2009. HIV type 1 drug

resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25:489-95.

30. Laurent C, Ngom Gueye NF, Ndour CT, Gueye PM, Diouf M, Diakhaté N, Touré Kane NC, Lanièce I, Ndir A, Vergne L, Ndoye I, Mboup S, Sow PS and Delaporte E; ANRS 1215/1290 Study Group. 2005. Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 38:14-7.

31. Tebit DM, Sangaré L, Makamtse A, Yameogo S, Somlare H, Bado G, Kouldiaty BG, Sathiandee K, Tiba F, Sanou I, Ouédraogo-Traoré R, Zoungrana L, Diallo I, Drabo JY and Kräusslich HG. 2008. HIV drug resistance pattern among HAART-exposed patients with suboptimal virological response in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 49:17-25.

32. Reynolds SJ, Kityo C, Mbamanya F, Dewar R, Ssali F, Quinn TC, Mugenyi P and Dybul M. 2009. Evolution of drug resistance after virological failure of a first-line highly active antiretroviral therapy regimen in Uganda. *Antivir Ther*. 14:293-7.

33. Koyalta D, Charpentier C, Beassamda J, Rey E, Si-Mohamed A, Djemadji-Oudjeil N and Bélec L. 2009. High frequency of antiretroviral drug resistance among HIV-infected adults receiving first-line highly active antiretroviral therapy in N'Djamena, Chad. *Clin Infect Dis*. 49:155-9.

34. Ait-Khaled M, Stone C, Amphlett G, Clotet B, Staszewski S, Katlama C and Tisdale M; CNA3002 International Study Team. 2002. M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. *AIDS*. 16:1686-9.

35. Garriga C, Pérez-Eliás MJ, Delgado R, Ruiz L, Nájera R, Pumarola T, Alonso-Socas Mdel M, García-Bujalance S and Menéndez-Arias L; Spanish Group for the Study of Antiretroviral Drug Resistance. 2007. Mutational patterns and correlated amino acid substitutions in the HIV-1 protease after virological failure to nelfinavir- and lopinavir/ritonavir-based treatments. *J Med Virol*. 79:1617-28.

36. Holguín A, Suñe C, Hamy F, Soriano V and Klimkait T. 2006. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol*. 36:264-71.

37. Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid JF, Boross P, Wang YF, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber IT, Ghosh AK and Mitsuya H. 2003. Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:3123-9.

38. Van Houtte M, Picchio G, Van Der Borgh K, Pattery T, Lecocq P and Bachelier LT. 2009. A comparison of HIV-1 drug susceptibility as provided by conventional phenotyping and by a phenotype prediction tool based on viral genotype. *J Med Virol.* 81:1702-9.
39. Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, Holguín A. 2010. HIV-1 non-B subtypes High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res.* 85:409-17.
40. Vergne L, Stuyver L, Van Houtte M, Butel C, Delaporte E, Peeters M. 2006. Natural polymorphism in protease and reverse transcriptase genes and in vitro antiretroviral drug susceptibilities of non-B HIV-1 strains from treatment-naive patients. *J Clin Virol.* 36:43-9.
41. Holguin, A., C. Sune, F. Hamy, V. Soriano, and T. Klimkait. 2006. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J. Clin. Virol.* 36:264–271.

### **3. Discussions générales**



La thérapie antirétrovirale (ART) permet de traiter les patients infectés par le VIH et peut aussi contribuer à réduire la transmission de l'infection. Par exemple, les études de prévention de la transmission mère-enfant montrent que les ARV peuvent avoir un effet sur la transmission du VIH<sup>346</sup>. De plus en plus, ART est mis de l'avant comme une partie importante d'une approche combinée de prévention. Cependant, les toxicités et les effets secondaires à long terme des ARV posent le problème d'adhésion aux traitements et ceci, couplé à un manque de suivi approprié, entraîne l'émergence des résistances aux médicaments<sup>347</sup>. La transmission de ces virus résistants aux personnes nouvellement infectées met à l'épreuve les possibilités thérapeutiques déjà limitées des pays en voie de développement.

Dans les pays industrialisés, malgré une grande expérience d'utilisation des ARV et des meilleures infrastructures sanitaires, la prévalence de la résistance primaire reste élevée variant entre 10 et 20%<sup>348</sup>.

Les pays en développement ont tardé à trouver la thérapie antirétrovirale. Ceci était surtout lié à une absence de volonté politique, de budget et la peur de ne pas pouvoir soutenir les efforts à long terme. Mais, depuis 1997, les ARV sont présents dans ces pays et gratuitement dispensés aux patients en 2004 dans certains pays comme le Mali. L'OMS recommande les thérapies de première ligne constituées d'une combinaison de deux INTI et un INNTI avec une grande efficacité, une bonne tolérance, simple et de faible coût<sup>349</sup>. Les protocoles thérapeutiques au Mali comme dans les autres pays en développement sont basés sur cette recommandation. La première ligne de traitement recommandée est une combinaison de d4T/3TC/NVP actuellement prescrit gratuitement pour la majorité des patients. Le schéma alternatif de première ligne est constitué

d'AZT/3TC/EFV ou encore ATZ/3TC/NVP. La deuxième ligne thérapeutique recommandée est la combinaison ABC/ddI/IDV et alternativement TDF et LPV ou IDV renforcés par le Ritonavir (IDV/rt). Cependant, les dernières recommandations suggèrent TDF en première ligne. Les régimes contenant les IP renforcés rapportent moins de mutations de résistance à cause de leur barrière génétique élevée.

La gratuité des ARV a permis une utilisation étendue et a suscité beaucoup d'espoirs pour les personnes infectées par le VIH dans les pays à ressources limitées. Cependant, l'émergence et la transmission de virus résistants pourraient compromettre l'efficacité des traitements spécifiquement dans les pays où les options thérapeutiques sont limitées<sup>350</sup>. De façon générale, les données préliminaires suggèrent que la résistance peut survenir dans les pays où les traitements antirétroviraux sont largement utilisés<sup>351</sup>. L'Afrique ne fait pas exception à la règle. Une des priorités dans ce cas, est d'évaluer l'effet de cette utilisation étendue sur la résistance aux traitements.

La première étape de ce travail a été d'évaluer la prévalence de la résistance primaire et les mutations associées chez 101 patients, en provenance du Mali, naïfs de tout traitement antirétroviral.

Nous avons observé que 71% de nos patients étaient infectés par la forme recombinante CRF02\_AG. Ce résultat confirme celui d'une étude antérieure effectuée au Mali en 2008 qui montre une prévalence de 72% pour ces formes recombinantes. Cependant, d'autres études effectuées dans ce pays montrent une prévalence des CRF02\_AG de 88% en 2002 et 75% en

2005<sup>300, 301</sup>. Ces résultats comparativement à notre 71% montrent une diminution dans le temps de la fréquence de cette forme recombinante. Cela pourrait être dû à l'émergence de nouvelles formes recombinantes telles que CRF13\_CPX et A2/CRF16-A2D qui n'étaient pas encore décrites au Mali avant notre étude. Ces nouvelles formes recombinantes pourraient refléter la diversification de l'épidémie de VIH-1 dans ce pays et cela en raison de la migration en provenance des pays voisins et des événements de recombinaison au sein de la population locale.

Juste après l'introduction des ARV, les premières estimations au Cameroun entre 2001-2004<sup>352</sup>, en Afrique du sud entre 2002 et 2004<sup>353</sup> et au Mali en 2005<sup>300</sup> ont montré une prévalence de résistance primaire inférieure à 5%. Ensuite, les études effectuées dans plusieurs autres pays ont confirmé cette faible prévalence. Par exemple, une étude au Congo en 2006 a montré une prévalence de 4,3%<sup>354</sup>. La même année un résultat similaire a été observé en Tanzanie<sup>355</sup>. En Ndjamena (Tchad), dans le cadre de leurs programmes de surveillance de la transmission la résistance, une étude sur les échantillons recueillis entre 2006-2007 a montré une prévalence également <5%<sup>356</sup>. Récemment, une prévalence <5% a été observée au Botswana<sup>357</sup>.

Cependant, dans notre étude, nous avons observé une prévalence de la résistance primaire de 9,9% (95% IC : 6,9-12,9). D'autres études effectuées précédemment au Mali dans les conditions similaires ont montré une prévalence de 0% en 2002 (n=35) et 2% (95% IC : 0-4,77) en 2005 (n=98)<sup>300</sup>. Ces résultats pris ensemble montrent une recrudescence de la résistance primaire au Mali. Cette progression pourrait refléter l'utilisation croissante des ARV dans ce pays. Cependant, l'augmentation de la prévalence de la résistance primaire n'est pas spécifique au Mali. D'autres pays d'Afrique affichent une tendance similaire. A commencer par les pays

limitrophes, le Burkina Faso montre un taux de 12,5%<sup>299</sup> et la Côte d'Ivoire 6%<sup>305</sup>. Cela pourrait être dû à des liens migratoires entre ces pays. Toutefois, plusieurs autres pays d'Afrique ont largement franchi la moyenne de 5,5% observée dans les pays en développement et le seuil des 5% fixé par l'OMS dans le cadre de la surveillance de la résistance<sup>297</sup>. Par exemple, une récente étude avec 408 patients nouvellement infectés a rapporté une prévalence de 7% en Afrique du Sud<sup>307</sup>. Une autre étude récente en Kampala en Ouganda chez 77 patients nouvellement infectés a montré une prévalence de 8,6%<sup>303</sup>. Au Cameroun, une étude auprès de 102 patients naïfs a montré une prévalence de 7,8%<sup>298</sup>. Par ailleurs, ces données nous montrent que la prévalence de la résistance est plus faible dans les pays en développement comparativement aux pays industrialisés où la prévalence est estimée entre 10 et 20%<sup>348</sup>. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que les pays en développement ne sont qu'au début de l'utilisation des ARV. Rappelons que les ARV ont été introduits en Afrique vers les années 2000, alors que les thérapies ont commencé dans les pays industrialisés en 1987. Cependant, avec peu d'expérience d'utilisation des ARV, ces résultats soulèvent des inquiétudes considérables.

L'analyse des mutations de résistance chez nos patients naïfs a montré que 5 patients avaient des mutations de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI). Les mutations observées chez ces patients étaient la M41L, D67N, M184V, T215A/Y et K219E. Ces mutations sont constituées en majorité de « *Thimidine Associated Mutation* » ou TAM à l'exception de la M184V qui confère la résistance à la lamivudine, FTC et une moindre mesure à l'ABC. Les mutations TAM entraînent la résistance à tous les analogues de la thymidine et dans une moindre mesure aux autres INTIs. La présence de ces mutations chez les patients naïfs compromet fortement les traitements de première ligne et une rapide sollicitation de ceux de

deuxième ligne. Ceci pourrait avoir des conséquences graves sur les stratégies thérapeutiques dans ces pays où les options sont beaucoup limitées.

Les mutations aux INNTIs suivantes: K103N, V108I, V179E et Y181C ont été observées chez 6 de nos patients. Ces mutations confèrent la résistance croisée à la plupart des INNTIs et pourraient à terme compromettre l'utilisation des INNTIs de deuxième génération. Par ailleurs, nous avons observé qu'un patient hébergeait trois mutations INTIs (M41L, M184V et T215Y) en plus d'une mutation INNTI, la K103N. Il s'agit là d'un premier cas rapporté de transmission de virus multi-résistant au Mali.

Les profils de mutations observées dans cette étude étaient compatibles avec l'utilisation généralisée de la triomune comme première ligne de traitement au Mali. La triomune est une combinaison d'ARV composée de la stavudine, la lamivudine et la nevirapine. Dans ce trio, la stavudine sélectionne les mutations TAM, la lamivudine la M184V et la nevirapine peut sélectionner l'ensemble des mutations INNTIs observées. Ces observations indiquent que le traitement des patients avec une résistance primaire sera compromis dès le départ, menant potentiellement à la transmission ultérieure de virus résistants aux ARV. Par ailleurs, elles peuvent aussi signifier que certains régimes de deuxième ligne seront moins efficaces qu'on ne le pensait. Ainsi, l'utilisation de schéma thérapeutique compromis peut ne pas entraîner les avantages attendus de prévention, c'est-à-dire diminuer la transmission du VIH. Rappelons que nous avons observé l'apparition de nouvelles formes recombinantes au Mali. Cette diversité croissante pourrait conduire à l'émergence de nouvelles voies de résistance, ce qui pourrait influencer sur le traitement de première ligne dans l'avenir. D'ailleurs, plusieurs études suggèrent

que les isolats de sous-types non-B, comparés au sous type B, montrent une tendance différente de mutations de résistance<sup>341,358</sup>. Par exemple, nous avons déjà montré dans notre laboratoire que le sous-type K choisit de préférence la voie (TAM2): D67N, K70R, K219Q et T215F en présence des INTI<sup>335</sup>. Toutefois, peu de données existent sur le sous-type CRF02\_AG.

Dans la deuxième partie de ce travail, ces questions ont été abordées dans une étude de cohorte de 132 patients, débutant une thérapie de première ligne, infectée majoritairement avec le sous-type CRF02\_AG. Dans cette étude, nous avons observé que 11/132 (8.3%) avait déjà des mutations de résistance avant l'initiation du traitement, dont 5 étaient en échec après traitement (Article2: tableau.2). Cela met en évidence l'impact de la transmission de la résistance sur les thérapies antirétrovirales. Les 6 autres patients, avec chacun une des mutations TAM suivantes: L210W, K219E et T251A n'étaient pas en échec après traitement, malgré la présence de D4T dans le régime. Cette observation pourrait indiquer que la présence d'une seule mutation TAM au départ n'affecterait pas les traitements de premières lignes chez le CRF02\_AG. Récemment, une autre étude au Mali a fait la même remarque, avec d'autres mutations TAM (D67N et K70R) chez les patients sous traitement pendant 6 mois<sup>359</sup>. Ces résultats pourraient être intéressants, car permettraient d'élargir les options thérapeutiques, avec utilisation possible d'autres analogues de thymidine dans les deuxièmes lignes chez les patients infectés par ce sous type. Toutefois, certains de nos patients n'avaient pas entièrement supprimé leur charge virale (124-324 copies/ml). Ainsi, seul un suivi à long terme pourra nous dire si cette suppression partielle est soutenue, car ces patients sont à risque d'échec à moyen terme. Dans notre étude, nous avons utilisé le séquençage conventionnel qui sous-estime les populations minoritaires de virus. Une

étude récente a montré que ces variantes minoritaires présentes sous le seuil de détection du séquençage conventionnel ont un impact défavorable sur les traitements ARV<sup>314</sup>.

Par ailleurs, 13 patients étaient en échec après traitement sans aucune mutation au T0. Parmi ces patients, les virus de 4 n'ont pas pu être séquencés, à cause d'une mauvaise qualité des échantillons. 4 autres patients n'avaient aucune mutation après traitement. Ceci pourrait refléter les questions liées à l'observance du traitement. Au Mali, comme dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest, la pénurie de fourniture des médicaments y compris les ARV, devient souvent un fardeau supplémentaire pour l'observance du traitement qui est déjà compliquée par l'instabilité sociale, la peur de divulgation de statut SIDA et des problèmes de tolérance aux traitements. Cependant, le faible nombre d'échecs indique que ces problèmes peuvent être surmontés. Les 5 patients restants ont sélectionné des mutations de résistance aux INTI et INNTI compatibles avec les régimes utilisés.

Globalement, nous avons observé que 8 patients avaient au moins une mutation de résistance à une des classes de médicament INTI et INNTI utilisées au Mali, après 9 mois de traitement, soit une prévalence de résistance secondaire de 6,10% (95% CI : 2.0-10.2%). Il est cependant difficile de comparer les études sur la résistance secondaire, en raison de différences dans les temps de suivi des patients et l'interprétation des résultats comme le choix des dénominateurs pour les calculs de prévalences. Toutefois, ce résultat est encourageant pour le Mali comparé à celui observé en Cote d'Ivoire, soit 14,2% (95% IC : 11,7-16,9) après un an de traitement<sup>308</sup>. Notre résultat est comparable au 12,5% (95% IC : 8-18,5) du Sénégal<sup>360</sup> et au 3,9% observé en Tanzanie après une année de traitement<sup>361</sup>. Des efforts peuvent être encore fournis pour réduire

ce taux, en améliorant l'observance et avec une bonne surveillance de la résistance. L'ensemble de ces résultats montre la variabilité de la prévalence de la résistance secondaire en Afrique.

Cependant, la réponse au traitement reste relativement bonne dans ce pays. Seulement, 14% de nos patients était en échec, soit une efficacité de 86%. Ce résultat est comparable à ceux d'autres études effectuées en Afrique. Par exemple, une étude au Botswana avec 630 patients a montré une bonne réponse virologique ( $CV < 400$ ) chez 91,3, 90,1 et 98% des patients respectivement après 1, 3 et 5 ans de traitement ARV<sup>362</sup>. Une autre étude très récente au Burkina auprès de 51 enfants, en traitement pendant 1 an, a montré une efficacité de traitement de 81% ( $CV < 300$ )<sup>363</sup>. En Afrique du Sud, une étude auprès de 675 patients, dont 66 enfants sous ARV pendant 12 mois, a montré une efficacité de traitement ( $CV < 400$ ) de 83% chez les adultes et 71% chez les enfants<sup>364</sup>. Notre résultat est aussi comparable au taux moyen d'efficacité ( $CV < 400$ ) de 82% (54-97), établi lors d'une étude récente de méta-analyse sur la résistance secondaire en Afrique<sup>365</sup>. Globalement, ces résultats sont impressionnants compte tenu des difficultés liées aux traitements ARV en Afrique, car ces valeurs sont comparables à celles observées dans les pays développés estimées autour de 75-89%<sup>366, 367</sup>. Toutefois, l'absence de bons outils de monitoring, comme la mesure de la charge virale, entrave le dépistage précoce des échecs aux traitements. Ceci entraîne l'accumulation de mutations de résistance et risque de compromettre les régimes de deuxième ligne thérapeutique. Il est connu que le maintien d'un traitement ARV, malgré l'échec, contribue efficacement à l'accumulation de mutations de résistance<sup>368, 369</sup>. Par exemple, l'étude de Napravnik et al avec une cohorte de 1605 patients a montré que 60% avait une nouvelle mutation en un temps médian de 9,3 mois avec un taux de 1,6 mutation par année<sup>369</sup>. Une autre étude très récente auprès de 837 patients a confirmé ce taux en montrant que 54,5% des patients montraient



une accumulation de mutations de résistance en raison de 1,6 mutation par année<sup>368</sup>. Par ailleurs, dans une méta-analyse de Gupta en 2009 avec une cohorte de 8376 patients, la fréquence de mutations de résistance était significativement élevée chez les patients sans monitoring régulier, avec 88,3% contre 61% avec un monitoring fréquent ( $p < 0,001$ )<sup>370</sup>.

Malheureusement, par faute de moyens, le monitoring fréquent est rarement utilisé dans les pays en développement. Le Mali n'échappe pas à cette dure réalité. La plupart de nos patients en échec après seulement 9 mois de traitement avaient déjà deux mutations de résistance aux INTI et INNTI. Ceci montre qu'en absence de monitoring, le risque d'accumulation de mutation est bien présent. La mutation aux INTI fréquemment observée chez nos patients était la M184V (75,0%). La mutation Y181C (37,5%) était la plus fréquemment observée pour les INNTIs suivi de K103N (25,0%). Les mêmes voies de mutation ont été observées dans d'autres études de la sous-région. Par exemple, une étude au Burkina Faso a montré que la mutation M184V était observée chez 57,3% des patients en échec<sup>333</sup>. Une fréquence de 64% a été observée en Tanzanie<sup>361</sup> et jusqu'à 75% et 86% respectivement dans les études en Cote d'ivoire<sup>308</sup> et Ouganda<sup>371</sup>. Cette grande fréquence de la mutation M184V est liée à la présence du 3TC dans les régimes de première ligne de la plupart des pays en développement. Dans notre étude, nous avons observé une plus grande proportion de la mutation Y181C plutôt que K103N, contrairement à d'autres études en Afrique où la mutation K103N était majoritairement observée. Par exemple, une étude au Burkina a montré 44% de K103N contre 16% d'Y181C<sup>333</sup>, Au Tchad, cette proportion était de 47% contre 35%<sup>372</sup> et jusqu'à 95% contre 2% en cote d'ivoire<sup>308</sup> respectivement pour K103N et Y181C. Ces observations pourraient être liées à l'utilisation de la nevirapine chez nos patients, contrairement à l'efavirenz dans les autres études. En outre, les

mutations TAM n'ont pas été sélectionnées chez nos patients. Cela pourrait être dû à une sélection rapide de la M184V par 3TC qui augmente la sensibilité de D4T, retardant ainsi l'apparition des TAM<sup>373</sup>.

Nous n'avons pas trouvé de mutations majeures aux inhibiteurs de protéase (IP) dans nos deux études. Ce constat pourrait être dû à l'utilisation limitée de ces molécules dans la première ligne thérapeutique au Mali. Toutefois, plusieurs polymorphismes ont été observés dans notre étude notamment dans le gène de la protéase, particulièrement L10I/V et L33F et au niveau du domaine de connexion de la transcriptase inverse tels que G335D et A371V. Ces polymorphismes ont été étudiés chez le sous-type B et leur rôle dans la résistance aux traitements est bien établi.

L10I/V a été associée à la perte de la réponse virologique à la plupart des IP, sauf le darunavir dans plusieurs études portant sur les sous-types B. Une étude de Para et al en 2000 a montré que la présence d'une substitution ou d'une combinaison de substitution au niveau des codons 10,20, 48, 82, 84 ou 90 était significativement associée à une réponse attendue au traitement par l'IDV et de même au niveau des codons 10, 73 et 84 pour le SQV<sup>374</sup>. Marcelin et al ont identifié 12 positions sur le gène de la protéase y compris L10 comme étant impliquées dans la réduction de la réponse virologique au SQV dans une étude chez 138 patients sous IP<sup>375</sup>. Dans une autre étude, le même groupe a montré que la L10I/V était parmi 14 mutations de la protéase impliquées dans la réduction de la réponse virologique au fosamprenavir<sup>376</sup>. La mutation L10I/V a été également associée à une diminution de la sensibilité au tipranavir<sup>369</sup>. L'étude de Vora et al en 2006 auprès de 62 patients a identifié 8 positions dans le gène de la protéase y compris L10

impliquées dans la résistance génotypique à l'atazanavir<sup>377</sup>. Par ailleurs, en 2007, l'étude de César avec 191 patients traités avec le nelfinavir ou le lopinavir a montré que la mutation L10I était fortement associée à l'échec thérapeutique<sup>378</sup>.

La mutation L10I/V est très fréquente chez les sous-types non B. Cependant, son rôle dans la résistance chez ce sous-type n'a pas été bien étudié. Dans notre étude de résistance primaire, nous l'avons observée chez 18,8% de nos patients n'ayant jamais été exposés aux IP. Toutefois, les IP sont susceptibles d'être utilisés dans les régimes de deuxième ligne en Afrique de l'Ouest. Par conséquent, il était donc important de disposer de données fiables sur l'impact de ces mutations sur la sensibilité des CRF02\_AG majoritairement présents dans cette région. Raison pour laquelle, nous avons étudié particulièrement cette mutation par mutagenèse dirigée dans la dernière partie de ce travail.

Dans cette étude les mutants CRF02\_AG<sub>L10I</sub>, CRF02\_AG<sub>L10V</sub> et type sauvage CRF02\_AG<sub>L10wt</sub> ont été sensibles à tous les IP testés. Comparativement à la souche de référence du sous-type B HXB2, DRV, LPV et NFV semblent présenter une légère augmentation de l'IC<sub>50</sub> chez le type sauvage CRF02\_AG<sub>wt\_L10</sub> avec respectivement un «*fold change*» (FC) de 1,2, 1,3 et 1,5. Toutefois, ces changements semblent ne pas être cliniquement significatifs, car ils sont sous les seuils biologiques définis par la plupart des algorithmes. Un constat important à noter est que le FC du lopinavir était proche de sa limite biologique de 1,6. Par ailleurs, notre virus mutant CRF02\_AG<sub>L10I</sub> a montré une légère augmentation d'IC<sub>50</sub> pour l'IDV (FC=1,3) comparativement au type sauvage CRF02\_AG<sub>wt\_L10</sub>. Même si ce changement de FC est faible, la mutation L10I pourrait contribuer à une diminution de la sensibilité une fois associée à d'autres

mutations de protéase. Le même constat a été fait pour le mutant CRF02\_AG<sub>L10V</sub> avec un FC de 1,2. Par ailleurs, nos deux mutants ont montré une hypersensibilité au lopinavir avec respectivement un FC de 0,78 et 0,75 pour CRF02\_AG<sub>L10I</sub> et CRF02\_AG<sub>L10V</sub>. La signification clinique de ces valeurs n'est pas déterminée. En outre, il a été montré que la mutation M36I entraîne une diminution de la sensibilité du SQV chez le CRF02\_AG<sup>139, 379</sup>. Cette mutation est un polymorphisme naturel survenant dans 99-100% des sous type non B<sup>380</sup> et était présente chez tous nos virus. Cependant, nous n'avons pas observé cette diminution de la sensibilité du SQV. Ceci pourrait suggérer que d'autres mutations dans la protéase ont pu compenser cet effet.

En ce qui concerne la mutation L33F, elle a été observée chez un patient. Cette mutation a été également rapportée dans l'étude de Derache et al effectuée au Mali<sup>301</sup>. Cette mutation est associée à une résistance de bas niveau à la plupart des IP. La mutation L33F n'épargne même pas le darunavir<sup>381</sup> et donne la résistance au lopinavir<sup>382</sup>, au nelfinavir<sup>383</sup> et à l'atazanavir<sup>383, 384</sup>. Par contre, l'impact de cette mutation reste à élucider chez le sous-type non-B. En raison d'une faible utilisation des IP au Mali, elle est plus susceptible d'être un simple polymorphisme.

En outre, nous avons également observé des polymorphismes dans le domaine de C-terminal de la transcriptase inverse (Acides aminés 293-560) ou domaine de connexion. Les mutations observées étaient la G335D (76%), A371V (63%), G399D (11%) et G333D (1%). Dans des études récentes, ces polymorphismes ont été particulièrement incriminés comme étant impliqués dans la résistance aux INTIs et INNTIs. Brehm et al ont montré que la mutation A371V en association avec les TAM conduit à une augmentation significative de la résistance à la zidovudine (AZT) et une résistance croisée à la lamivudine (3TC) et à l'abacavir (ABC), mais

pas à la stavudine (d4T) ou la didanosine (ddI)<sup>385</sup>. Il a été aussi montré que la mutation G335D en association avec les mutations TAM provoque une forte résistance à l'AZT<sup>386</sup>. Très récemment, il a été confirmé que la mutation en position 335 est fortement associée à la résistance à l'AZT<sup>240</sup>. Récemment, il a été montré que les mutations G333D, A371V et G335D facilitent une double résistance à l'AZT et 3TC en association avec les TAM ou la mutation M184V<sup>242</sup>. Cependant, peu d'études ont examiné l'impact des mutations dans le domaine de connexion sur la résistance chez le sous-type non-B. Une étude récente a montré que les mutations G335D et A371V ne suffisent pas pour provoquer une résistance indépendamment des sous-types, mais en association avec M184V, elles conduisent à un haut niveau de résistance à l'AZT<sup>241</sup>. Dans notre étude de résistance secondaire, un constat majeur a été qu'aucun de nos patients en échec et qui avait les mutations G335D et A371V avant l'initiation du traitement n'a développé une association avec M184V. Une hypothèse serait que la présence de ces mutations avant l'initiation du traitement permettrait d'éviter son association avec la mutation M184V chez les sous-types non-B. Ainsi, toutes ces études soulèvent l'intérêt d'investiguer plus encore ces mutations chez les sous-types non-B d'une part et posent la question d'inclure ces mutations dans les tests de résistance génotypiques et phénotypes dans le but d'une détermination plus précise de la résistance au moins pour l'AZT.

## **4. Conclusion**

Nous retenons de notre étude que la résistance primaire est en augmentation au Mali. Ce constat répond positivement à une partie de notre hypothèse. Comparativement à d'autres études effectuées au Mali, nos résultats indiquent clairement que la résistance primaire est en augmentation dans ce pays. Ceci est très probablement dû à une large utilisation des ARV. Cette augmentation est inquiétante dans un contexte d'option limitée pour la première ligne thérapeutique à plus forte raison la deuxième ligne. Il est donc impératif de surveiller régulièrement le développement de la résistance dans ce pays ainsi que d'autres pays à ressources limitées afin de fournir des informations indispensables à l'amélioration de nos stratégies de traitements. Cependant, comme avec d'autres cohortes sur les traitements dans la sous-région d'Afrique de l'Ouest, nous avons observé une bonne réponse aux traitements. Les voies de la résistance conduisant à l'échec aux traitements dans notre cohorte semblent être similaires à celles observées chez le sous-type B : M184V, K103N et Y181C. Les mutations au domaine de connexion ont été fréquemment observées dans notre étude. Par contre, elles semblent ne pas jouer un rôle majeur dans l'échec aux traitements. Toutefois, la présence de la mutation G335D avant l'initiation du traitement permettrait d'éviter l'association avec le M184V chez le sous-type non-B. La mutation 10I/V semble avoir un impact limité sur la sensibilité des IP in vitro chez le CRF02\_AG. Par ailleurs, l'impact de cette mutation en association avec d'autres mutations de la protéase reste encore inconnu chez le sous-type non-B.

## **5. Bibliographie**



1. Charles Chamberland (1851-1908). <http://www.pasteur.fr/infosci/archives/chb0.html>
2. Claude Chastel. Naissance de la virologie. *Virologie* 1997; 1:103-10
3. Reed W, Carroll J, Agramonte A, Lazear W. The etiology of yellow fever: a preliminary note. *Public Health Pap Rep.* 1900; 26: 37-53.
4. UNAIDS. HIV Epidemic Update 2009. [http://data.unaids.org/pub/Report/2010/2009\\_annual\\_report\\_fr.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2010/2009_annual_report_fr.pdf)
5. van der Graaf M, Diepersloot RJ . Transmission of human immunodeficiency virus (HIV/HTLV-III/LAV): a review. *Infection* 1986; 14:203-11.
6. Kim HC, Nahum K, Raska K Jr, Gocke DJ, Kosmin M, Karp GI, Saidi P. Natural history of acquired immunodeficiency syndrome in hemophilic patients. *Am J Hematol* 1987; 24:169-76.
7. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.
8. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.
9. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225:840-842
10. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985; 40:9-17.
11. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dautet C, Katlama C, Rouzioux C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-6.
12. UNAIDS. HIV Epidemic Update 2010. <http://www.unaids.org/fr/Dataanalysis/Epidemiology>
13. Rapport ONSIDA 2011. [http://www.unaids.org/en/media/unaid/contentassets/documents/unaidpublication/2011/JC2216\\_WorldAIDSday\\_report\\_2011\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaid/contentassets/documents/unaidpublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_fr.pdf)
14. Rapport 2010 sous la direction de Pr Patrick Yeni. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH, Recommandation du groupe d'expert Ministère de la santé et des sports. [www.sante.gouv.fr](http://www.sante.gouv.fr)

15. HPTN052, Results for immediate release 2011. [http://www.hptn.org/web%20documents/PressReleases/HPTN052pressReleaseFINAL5\\_12\\_118am.pdf](http://www.hptn.org/web%20documents/PressReleases/HPTN052pressReleaseFINAL5_12_118am.pdf)
16. Charlotte Lewden and the Mortality Working Group of COHERE. Time with CD4 Cell Count above 500 cells/mm<sup>3</sup> Allows HIV-infected Men, but Not Women, to Reach Similar Mortality Rates to Those of the General Population: A 7-year Analysis. CROI 2010. Paper # 527.
17. START, for immediate release 2011. <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2011/Pages/START.aspx>
18. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267:483-489.
19. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242:1168-71.
20. Ren J, Bird LE, Chamberlain PP, Stewart-Jones GB, Stuart DI, Stammers DK. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14410-14415
21. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 1-25
22. Bour S, Strebel K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes infect*: 2003; 5:1029-1039.
23. Darlix JL, Lapadat-Tapolsky M, de Rocquigny H, Roques B. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* 1995; 25: 523-37.
24. Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger H. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13063-8.
25. Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, Bonifacino JS. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J. Virol* 2007 81: 3877–3890.
26. Lubben NB, Sahlender DA, Motley AM, Lehner PJ, Benaroch P, Robinson MS. HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. *Mol. Biol. Cell* 2007; 18:3351–3365.
27. Noviello CM, Benichou S, Guatelli JC. Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunodeficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its mu subunit. *J. Virol* 2008; 82:1249–1258.
28. Mehellou Y, De Clercq E. Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go? *J Med Chem* 2010; 53:521-38.

- 29.** Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984; 312:767-8
- 30.** Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984. 312:763-7.
- 31.** Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393:648-59.
- 32.** Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA, Arthos J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 2002; 420:678-82.
- 33.** Sterjovski J, Churchill MJ, Roche M, Ellett A, Farrugia W, Wesselingh SL, Cunningham AL, Ramsland PA, Gorry PR. CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120-CD4 interactions and fusogenicity. *Virology* 2011; 410:418-28.
- 34.** Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47:333-348.
- 35.** Berger E. HIV entry and tropism: the chemokine receptor expression. *AIDS* 1997; 11(suppl A): S3.
- 36.** Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:657-700.
- 37.** Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-877.
- 38.** Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8 + T cells. *Science* 1995; 270:1811-1815.
- 39.** Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661-6
- 40.** Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4 + cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-673.

41. Edinger AL, Blanpain C, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Parmentier M, Doms RW. Functional dissections of CCR5 coreceptor function through the use of CD4-independent simian immunodeficiency virus strains. *J Virol* 1999; 73:4062-4073.
42. Dong HF, Wigmore K, Carrington MN, Dean M, Turpin JA, Howard OM. Variants of CCR5, which are permissive for HIV-1 infection, show distinct functional responses to CCL3, CCL4 and CCL5. *Genes Immun* 2005; 6:609-19.
43. Myszka, D.G., Sweet, R.W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A., Wyatt, R., Sodroski, J., Doyle, M.L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9026-9031.
44. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005; 433: 834-841.
45. Brelot A, Heveker N, Adema K, Hosie MJ, Willett B, Alison M. Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J. Virol* 1999; 73:2576-2586.
46. Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 2005; 310:1025-1028.
47. Ross TM and Cullen BT. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7682-7686.
48. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso R. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 1996; 2:1244-1247.
49. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89:263-73.
50. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681-684.
51. Layne SP, Merges MJ, Dembo M, Spouge JL, Conley SR, Moore JP, Raina JL, Renz H, Gelderblom HR, Nara PL. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* 1992; 189:695-714.
52. Nathalie Arhel, Pierre Charneau. Devenir du génome VIH-1: du transport intracellulaire jusqu'à l'intégration. *Virologie* 2009, 13 (no special): S5-S13.

- 53.** Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Charneau P. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 2007; 26:3025-37.
- 54.** McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 2002; 159:441-52.
- 55.** Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* 2008; 134:19-38.
- 56.** Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 1997; 71:5382-5390.
- 57.** Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* 1998; 188:2113-25.
- 58.** Arhel N, Genovesio A, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC, Shorte S, Charneau P. Quantitative fourdimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* 2006; 3:817-24.
- 59.** Sherman MP and Greene WC. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect*: 2002; 4: 67-73.
- 60.** Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:236-48.
- 61.** Zhou Q, Sharp PA. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *EMBO J* 1995; 14:321-8.
- 62.** Isel C, Karn J. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol* 1999; 290:929-41.
- 63.** Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* 1988; 62: 2578-86.
- 64.** Joshi A, Ablan SD, Soheilian F, Nagashima K, Freed EO. Evidence that productive human immunodeficiency virus type 1 assembly can occur in an intracellular compartment. *J Virol*. 2009; 83:5375-87.
- 65.** Jouvenet N, Neil SJ, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 2006; 4: e435.

66. Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Kräusslich HG. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 2007; 3: e36.
67. Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen EA. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J Virol* 2007; 81:7476-90.
68. Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:5246-51.
69. Antoine Corbin, Boyan Grigorov, Philippe Roingeard, Jean-Luc Darlix, Delphine Muriaux. Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1. *Medicine/Sciences* 2008; 24:49-55.
70. Gatignol A, Dubuisson J, Wainberg MA, Cohen EA, Darlix JL. New pandemics: HIV and AIDS, HCV and chronic hepatitis, influenza virus and flu. *Retrovirology* 2007; 4:8.
71. Byland R, Vance PJ, Hoxie JA, Marsh M. A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 414-25.
72. Woodman Z and Williamson C. HIV molecular epidemiology: transmission and adaptation to human populations. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4:247-52.
73. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:6588-92.
74. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006; 313:523–526.
75. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 2001; 58:19-42.
76. Margeridon-Therm S and Shafer RW. Comparison of the Mechanisms of Drug Resistance among HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C. *Viruses* 2010; 2:2696-2739.
77. Tebit DM and Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 2011; 11:45-56.
78. Los Alamos National Laboratory database. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
79. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:W13-23.

- 80.** Yamaguchi J, Devare SG, Brennan CA. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:925-30.
- 81.** UNAIDS. HIV Epidemic Update 2008. [http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008\\_Global\\_report.asp](http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp) (accessed Sept 16, 2010).
- 82.** Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; 15:871-2.
- 83.** Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptué L, Ndembi N, Gürtler L, Devare S, Brennan CA. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* 2011; 85:1403-7.
- 84.** Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A, Bailes E, Van Heuverswyn F, Decker JM, Li Y, Rudicell RS, Learn GH, Neel C, Ngole EM, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Hahn BH. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J Virol* 2009; 83:1635-1648.
- 85.** Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994; 68:1581-5.
- 86.** Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn H, Saman E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 1994; 68:1586-96.
- 87.** Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden Haesevelde M, Delaporte E. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* 1997; 11:493-8.
- 88.** Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vézinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4:1032-7.
- 89.** Ayouba A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Mauciere P, Simon F, Nerrienet E. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 2000; 14:2623–2625.
- 90.** Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 2007; 81:10209-19.

- 91.** Kostrikis L, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho D. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus : identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995; 69:6122-30.
- 92.** Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Wolinsky S, Korber B. A reference guide to HIV-1 classification. *Human Retroviruses and Aids: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM Theoretical Biology and Biophysics Group, 1999: 492-505
- 93.** 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.
- 94.** Peeters M, Aghokeng AF, Delaporte E. Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1525-31.
- 95.** Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 2011; 25:679-89
- 96.** Chiu YL and Greene WC. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol* 2006; 27:291-297.
- 97.** Onafuwa-Nuga A and Telesnitsky A. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73:451-80.
- 98.** Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271:1582-6.
- 99.** Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 2003; 19:207-16.
- 100.** Fitzgibbon JE, Mazar S, Dubin DT. A new type of G-->A hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:833-8.
- 101.** Borman AM, Quillent C, Charneau P, Kean KM, Clavel F. A highly defective HIV-1 group O provirus: evidence for the role of local sequence determinants in G-->A hypermutation during negative-strand viral DNA synthesis. *Virology* 1995; 208:601-9.
- 102.** Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 2005; 435:108-114.



- 103.** Bogerd HP and Cullen BR. Single-stranded RNA facilitates nucleocapsid: APOBEC3G complex formation. *RNA*. 2008. 14, 1228-1236.
- 104.** Soros VB, Yonemoto W, Greene WC. Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* 2007. 3: e15.
- 105.** Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J, Kleiman L. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 2004; 279:33177-84.
- 106.** Wyke JA and Beaman JA. Genetic recombination in Rous sarcoma virus: the genesis of recombinants and lack of evidence for linkage between pol, env and src genes in three factor crosses. *J. Gen. Virol* 1979; 43:349-364.
- 107.** Moutouh LJ, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:6106-6111.
- 108.** Kuwata T, Miyazaki Y, Igarashi T, Takehisa J, Hayami M. The rapid spread of recombinants during a natural in vitro infection with two human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol* 1997; 71:7088-7091.
- 109.** Fultz PN, Yue L, Wei Q, Girard M. Human immunodeficiency virus type 1 intersubtype (B/E) recombination in a superinfected chimpanzee. *J. Virol* 1997; 71:7990–7995.
- 110.** Wooley DP, Smith RA, Czajak S, Desrosiers RC. Desrosiers. Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. *J. Virol* 1997; 71:9650–9653.
- 111.** Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F, Kimani J, Shi B, Kaul R, Bwayo J, Anzala O, Burger H. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS* 2004; 18:153–159.
- 112.** Altfeld M, Allen TM, Yu X G, Johnston MN, Agrawal D, Korber BT, Montefiori DC, O'Connor DH, Davis BT, Lee PK, Maier EL, Harlow J, Goulder PJ, Brander C, Rosenberg ES, Walker BD. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 2002; 420:434–439.
- 113.** Chohan B, Lavreys L, Rainwater SM, Overbaugh J. Evidence for frequent reinfection with human immunodeficiency virus type 1 of a different subtype. *J. Virol* 2005; 79:10701-10708.
- 114.** Van der Kuyl AC, Kozaczynska K van den Burg R, Zorgdrager F, Back N, Jurriaans S, Berkhout B, Reiss P, Cornelissen M. Triple HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med* 2005; 352:2557-2559.

- 115.** Pernas M, Casado C, Fuentes R, Perez-Elias MJ, Lopez-Galindez C. A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primoinfection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 2006; 42:12-18.
- 116.** Gratton S, Cheynier R, Dumaurier MJ, Oksenhendler E, Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:14566–14571.
- 117.** Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, Meese E, S. Wain-Hobson S, Meyerhans A. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 2002; 48:144.
- 118.** McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003; 300:1295-7.
- 119.** Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med* 2004; 199:283-293.
- 120.** Paillart JC, Shehu-Xhilaga M, Marquet R, Mak J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:461-72.
- 121.** Panganiban AT and Fiore D. Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. *Science* 1988; 241:1064-1069.
- 122.** Hu WS and Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990; 250:1227-1233.
- 123.** Yu H, Jetzt AE, Dougherty JP. Use of single-cycle analysis to study rates and mechanisms of retroviral mutation. *Methods* 1997; 12:325-336.
- 124.** Andersen ES, Jeeninga RE, Damgaard CK, Berkhout B, Kijms J. Dimerization and template switching in the 5' untranslated region between various subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* 2003; 77:3020-3030.
- 125.** Chin MP, Rhodes TD, Chen J, Fu W, Hu WS. Identification of a major restriction in HIV-1 intersubtype recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9002-7.
- 126.** Liitsola K, Tashkinova I, Laukkanen T, Korovina G, Smolskaja T, Momot O, Mashkilleyson N, Chaplinskis S, Brummer-Korvenkontio H, Vanhatalo J, Leinikki P, Salminen MO. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 1998 12:1907-19.
- 127.** Zhang J, Tang LY, Li T, Ma Y, Sapp CM. Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J Virol* 2000; 74:2313-22.

- 128.** Boone LR and Skalka AM. Strand displacement synthesis by reverse transcriptase. In: Skalka AM, Goff SP, eds. Reverse transcriptase. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1993: 251-74.
- 129.** Magiorkinis G, Paraskevis D, Vandamme AM, Magiorkinis E, Sypsa V, Hatzakis A. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* 2003; 84:2715-22.
- 130.** Simon-Lorière E, Galetto R, Negroni M. Caractéristiques mécanistiques de la recombinaison chez le virus de l'immunodéficience humaine. *Virologie* 2006; 10:431-42
- 131.** Coffin JM. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* 1979; 42:1-26.
- 132.** Sanchez G, Xu X, Chermann JC, Hirsch I. Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol* 1997; 71:2233-2240.
- 133.** DeStefano JJ, Mallaber LM, Rodriguez-Rodriguez L, Fay PJ, Bambara RA. Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 1992; 66:6370-8.
- 134.** DeStefano JJ, Bambara RA, Fay PJ. The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J Biol Chem* 1994; 269:161-8.
- 135.** Wu W, Blumberg BM, Fay PJ, Bambara RA. Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation. *J Biol Chem* 1995; 270:325-32.
- 136.** Negroni M and Buc H. Copy-choice recombination by reverse transcriptases: reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:6385-6390.
- 137.** Chen Y, Balakrishnan M, Roques BP, Bambara RA. Steps of the acceptor invasion mechanism for HIV-1 minus strand strong stop transfer. *J Biol Chem* 2003; 278:38368-38375.
- 138.** Gao L, Balakrishnan M, Roques BP, Bambara RA. Insights into the multiple roles of pausing in HIV-1 reverse transcriptase-promoted strand transfers. *J Biol Chem* 2007; 282:6222-6231.
- 139.** Holguín A, Suñe C, Hamy F, Soriano V, Klimkait T. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol.* 2006 Aug;36(4):264-71.

- 140.** White KL, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Miller MD, Naeger LK. Molecular mechanisms of resistance to human immunodeficiency virus type 1 with reverse transcriptase mutations K65R and K65R+M184V and their effects on enzyme function and viral replication capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3437-46.
- 141.** Wang J, Bambara RA, Demeter LM, Dykes C. Reduced fitness in cell culture of HIV-1 with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations correlates with relative levels of reverse transcriptase content and RNase H activity in virions. *J Virol* 2010; 84:9377-89.
- 142.** Cardinaud S, Consiglieri G, Bouziat R, Urrutia A, Graff-Dubois S, Fourati S, Malet I, Guergnon J, Guihot A, Katlama C, Autran B, van Endert P, Lemonnier FA, Appay V, Schwartz O, Kloetzel PM, Moris A. CTL escape mediated by proteasomal destruction of an HIV-1 cryptic epitope. *PLoS Pathog* 2011; 7:e1002049.
- 143.** Ancelle R, Bletry O, Baglin AC, Brun-Vezinet F, Rey MA, Godeau P. Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet* 1987; 8534:688-689.
- 144.** Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265:1587-90.
- 145.** MacNeil A, Sarr AD, Sankalé JL, Meloni ST, Mboup S, Kanki P. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* 2007; 81:5325-30.
- 146.** Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, Fawzi W, Hunter D. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin Infect Dis* 2006; 42:843-52.
- 147.** Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, Eller LA, Eller M, Makumbi F, Birx D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Sewankambo NK, Quinn TC, Wawer M, Gray R. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2008; 197:707-713.
- 148.** Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, Tatt ID, Geretti AM, Zuckerman M. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc.* 2010; 3:13:14.
- 149.** Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M; Tanzanian Vitamin and HIV Study Group. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 2004; 18:1629-1636.

- 150.** Rodriguez MA, Ding M, Ratner D, Chen Y, Tripathy SP, Kulkarni SS, Chatterjee R, Tarwater PM, Gupta P. High replication fitness and transmission efficiency of HIV-1 subtype C from India: Implications for subtype C predominance. *Virology* 2009; 385:416-24.
- 151.** Montano M, Russell M, Gilbert P, Thior I, Lockman S, Shapiro R, Chang SY, Lee TH, Essex M. Comparative prediction of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission, using multiple virus load markers. *J Infect Dis* 2003; 188:406-413.
- 152.** Arias RA, Munoz LD, Munoz-Fernandez, MA. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003; 307:266-277.
- 153.** Gueudin M, Lemée V, Ferre V, Beby-Defaux A, Pathé JP, Guist'hau O, Braun J, Simon F, Plantier JC. Virologic diagnosis and follow-up of children born to mothers infected by HIV-1 group O. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36:639-41.
- 154.** Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, de Mendoza C. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1031-6.
- 155.** Wang S, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnol Adv* 2010; 28:770-81.
- 156.** Sire JM, Vray M, Merzouk M, Plantier JC, Pavie J, Maylin S, Timsit J, Lascoux-Combe C, Molina JM, Simon F, Delaugerre C. Comparative RNA quantification of HIV-1 group M and non-M with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 and Abbott Real-Time HIV-1 PCR assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 56:239-43.
- 157.** Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, Gill MJ. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J Clin Microbiol* 2011; 49:118-24.
- 158.** Database of AIDS Vaccine Candidates in Clinical Trials: last updated, 05/10/ 2011  
<http://www.iavireport.org/trials-db/Pages/default.aspx>
- 159.** Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K; Bangkok Vaccine Evaluation Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* 2006; 194:1661-71.
- 160.** Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF; rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 191:654-665.

- 161.** Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009; 361:2209-20.
- 162.** McBurney SP and Ross TM. Viral sequence diversity: challenges for AIDS vaccine designs. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7:1405-17.
- 163.** Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, Wu X, Shaw GM, Connors M, Wyatt RT, Mascola JR. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* 2007; 13:1032-4.
- 164.** Chen L, Kwon YD, Zhou T, Wu X, O'Dell S, Cavacini L, Hessel AJ, Pancera M, Tang M, Xu L, Yang ZY, Zhang MY, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Nabel GJ, Posner MR, Sodroski J, Wyatt R, Mascola JR, Kwong PD. Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* 2009; 326:1123-7.
- 165.** Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD, Wu L, Xu L, Longo NS, McKee K, O'Dell S, Louder MK, Wycuff DL, Feng Y, Nason M, Doria-Rose N, Connors M, Kwong PD, Roederer M, Wyatt RT, Nabel GJ, Mascola JR. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 2010; 329:856-61.
- 166.** Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*. 2010; 329:811-7.
- 167.** McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:11-23.
- 168.** Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998; 128:613-620.
- 169.** Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, Sun C, Grayson T, Wang S, Li H, Wei X, Jiang C, Kirchherr JL, Gao F, Anderson JA, Ping LH, Swanstrom R, Tomaras GD, Blattner WA, Goepfert PA, Kilby JM, Saag MS, Delwart EL, Busch MP, Cohen MS, Montefiori DC, Haynes BF, Gaschen B, Athreya GS, Lee HY, Wood N, Seoighe C, Perelson AS, Bhattacharya T, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:7552-7557.
- 170.** Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, Heil ML, Kasolo F, Musonda R, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, Allen S, Hunter E. Envelope-

constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 2004; 303:2019-2022.

**171.** Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. Vaginal CD4<sup>+</sup> T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2003; 187:769-776.

**172.** Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66:1354-60.

**173.** Hussain LA and Lehner T. Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* 1995; 85:475-84.

**174.** Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100:587-597.

**175.** Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC: CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:749-759.

**176.** Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12.

**177.** Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest* 1998; 101:746-754.

**178.** Monteiro P, Gosselin A, Wacleche VS, El-Far M, Said EA, Kared H, Grandvaux N, Boulassel MR, Routy JP, Ancuta P. Memory CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin  $\beta$ 7. *J Immunol* 2011; 186:4618-30.

**179.** Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005; 434:1093-1097.

**180.** Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 2010; 22:7:54.

**181.** Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. Peak SIV replication in resting memory CD4<sup>+</sup> T cells depletes gut lamina propria CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* 2005; 434:1148-52.

- 182.** Iglesias-Ussel MD and Romerio F. HIV reservoirs: the new frontier. *AIDS Rev* 2011; 13:13-29
- 183.** Joos B, Fischer M, Kuster H, Pillai SK, Wong JK, Böni J, Hirschel B, Weber R, Trkola A, Günthard HF; Swiss HIV Cohort Study. HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16725-16730.
- 184.** Dahl V, Josefsson L, Palmer S. HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral Res* 2010; 85:286-94.
- 185.** Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283:857-860.
- 186.** Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68:6103-6110.
- 187.** Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 2006; 12:289-95.
- 188.** Poropatich K and Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol* 2011; 92:247-68.
- 189.** Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev.* 2003 Oct-Dec;5(4):230-44.
- 190.** Deeks SG and Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007; 27:406-16.
- 191.** Ford ES, Puroden CE, Sereti I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4:206-214.
- 192.** Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC: Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12:1365-1371.
- 193.** Purcell DFJ, Lewin SR, Byakwaga H, French MA, Kelleher AD, Amin J, Haskelberg H, Kelly M, Cooper DA, Emery S, on behalf of the CORAL Study Group. «No Correlation between Microbial Translocation, Immune Activation, and Low-level HIV Viremia in HIV-infected Individuals with Poor CD4+ T Cell Recovery Despite Suppressive ART », CROI 2011, Poster # 304



- 194.** Sudheesh Pilakka-Kanthikeel, Huang S, Fenton T, Borkowsky W, Cunningham C, Pahwa S. « Microbial Translocation Is Increased in HIV-infected Children on ART and Is Independent of Viral Replication and Immune Activation », CROI 2011, Poster # 728
- 195.** Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16:83-92.
- 196.** Shive C, Lederan M, Calabrese L, Funderburg N, Bonilla H, Gripshover B, Salata R, McComsey G, Sieg S Rodriguez B. « Immunologic Failure Despite Suppressive ART Is Related to Increased Inflammation and Evidence of Microbial Translocation », CROI 2011, Poster # 320
- 197.** Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA. Overview of HIV. *Psychosom Med* 2008; 70:523-30.
- 198.** Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1985; 82:7096-7100.
- 199.** Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldridge A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem* 2007; 282:28709-20.
- 200.** Prada N and Markowitz M. Novel integrase inhibitors for HIV. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; 19:1087-98.
- 201.** Marinello J, Marchand C, Mott BT, Bain A, Thomas CJ, Pommier Y. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. *Biochemistry* 2008; 47:9345-54
- 202.** Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Mutsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kamo M, Ikeda S, Matsuoka M. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* 2008; 82:764-74.
- 203.** Li L, Sun T, Yang K, Zhang P, Jia WQ. Monoclonal CCR5 antibody for treatment of people with HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 8:CD008439.
- 204.** Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol Pharmacol* 2008; 73:789-800
- 205.** Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:1051-3.

- 206.** Keller PW, Adamson CS, Heymann JB, Freed EO, Steven AC. HIV-1 maturation inhibitor bevirimat stabilizes the immature Gag lattice. *J Virol* 2011; 85:1420-8.
- 207.** Wainberg MA and Albert J. Can the further clinical development of bevirimat be justified? *AIDS* 2010; 24:773-4
- 208.** Hachiya A, Kodama EN, Schuckmann MM, Kirby KA, Michailidis E, Sakagami Y, Oka S, Singh K, Sarafianos SG. K70Q adds high-level tenofovir resistance to "Q151M complex" HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 2011; 6:e16242.
- 209.** Kati WM, Johnson KA, Jerva LF, Anderson KS. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* 1992; 267:25988-97.
- 210.** Sarafianos SG, Das K, Clark AD Jr, Ding J, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10027-32.
- 211.** Boucher CA, Cammack N, Schipper P, Schuurman R, Rouse P, Wainberg MA, Cameron JM. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2231-4.
- 212.** Feng JY and Anderson KS. Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC resistant mutant (M184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 1999; 38:9440-8.
- 213.** International AIDS society-USA. Special contribution: Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. *Top in HIV Med* 2010; 18:156-63.  
[http://www.iasusa.org/resistance\\_mutations/mutations\\_figures.pdf](http://www.iasusa.org/resistance_mutations/mutations_figures.pdf)
- 214.** Iversen AK, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, Merigan TC. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1996; 70:1086-90.
- 215.** Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2002; 76:3248-56.
- 216.** Meyer PR, Matsuura SE, So AG, Scott WA. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13471-6.

- 217.** Naeger LK, Margot N, Miller MD. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents Chemother* 2002; 46:2179-234.
- 218.** Brun-Vezinet F, Descamps D, Ruffault A, Masquelier B, Calvez V, Peytavin G, Telles F, Morand-Joubert L, Meynard JL, Vray M, Costagliola D, Narval (ANRS 088) study group. Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *AIDS* 2003; 17:1795-802.
- 219.** Masquelier B, Tamalet C, Montès B, Descamps D, Peytavin G, Bocket L, Wriden M, Izopet J, Schneider V, Ferré V, Ruffault A, Palmer P, Trylesinski A, Miller M, Brun-Vézinet F, Costagliola D, ARNS AC11 Resistance study group. Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* 2004; 9:315-23.
- 220.** Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision. *J Virol* 2002; 76:9143-51.
- 221.** Zhang D, Caliendo AM, Eron JJ, DeVore KM, Kaplan JC, Hirsch MS, D'Aquila RT. Resistance to 2', 3'-dideoxycytidine Conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents Chemother* 1994; 38:282-7.
- 222.** Gu Z, Gao Q, Fang H, Salomon H, Pamiak MA, Goldberg E, Cameron J, Wainberg MA. Identification of a mutation at codon 65 in the KKK motif of reverse transcriptase that encodes human immunodeficiency virus resistance to 2', 3'-dideoxycytidine and 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrobial Agents Chemother* 1994; 38:275-81.
- 223.** Harrigan PR, Stone C, Griffin P, Nájera I, Bloor S, Kemp S, Tisdale M, Larder B. Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J Infect Dis* 2000; 181:912-20.
- 224.** Stone C, Griffin P, Mesogiti D, Cutrell A, Harrigan R, Staszewski S, Katlama C, Pearce G, Tisdale M. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *AIDS* 2000; 14:163-71.
- 225.** Zelina S and Mellors JW. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* 2007; 21:1405-14.
- 226.** Valer L, Martín-Carbonero L, de Mendoza C, Corral A, Soriano V. Predictors of selection of K65R: tenofovir use and lack of thymidine analogue mutations. 2004; 18:2094-6.
- 227.** B Masquelier. Mécanismes moléculaires de la résistance du VIH aux inhibiteurs Nucléosidiques. *Virologie* 2004; 5:345-54

- 228.** Brenner BG and Coutsinos D. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications. *HIV Ther* 2009; 3:583-594.
- 229.** Ren J and Stammers DK. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res* 2008; 134:157-70.
- 230.** Chan JH, Hong JS, Hunter RN 3rd, Orr GF, Cowan JR, Sherman DB, Sparks SM, Reitter BE, Andrews CW 3rd, Hazen RJ, St Clair M, Boone LR, Ferris RG, Creech KL, Roberts GB, Short SA, Weaver K, Ott RJ, Ren J, Hopkins A, Stuart DI, Stammers DK. 2-Amino-6-arylsulfonylbenzotrioles as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1. *J Med Chem* 2001; 44:1866-1882.
- 231.** Ren J, Nichols CE, Stamp A, Chamberlain PP, Ferris R, Weaver KL, Short SA, Stammers DK. Structural insights into mechanisms of non-nucleoside drug resistance for HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 101 or 138. *FEBS J* 2006; 273:3850-3860.
- 232.** Ren J, Nichols CE, Chamberlain PP, Weaver KL, Short SA, Chan JH, Kleim JP, Stammers DK. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild-type, Leu100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases. *J Med Chem* 2007; 50:2301-2309.
- 233.** Das K, Sarafianos SG, Clark AD Jr, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBY 097. *J Mol Biol* 2007; 365:77-89.
- 234.** Das K, Clark AD Jr, Boyer PL, Lewi P, Janssen PA, Kleim JP, Rösner M, Hughes SH, Arnold E. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol* 2001; 309:437-445.
- 235.** Asahchop EL, Oliveira M, Wainberg MA, Brenner BG, Moisi D, Toni T, Tremblay CL. Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes. 2011; 55:600-7.
- 236.** Dueweke TJ, Pushkarskaya T, Poppe SM, Swaney SM, Zhao JQ, Chen IS, Stevenson M, Tarpley WG. A mutation in reverse transcriptase of bis(heteroaryl)piperazine-resistant human immunodeficiency virus type 1 that confers increased sensitivity to other nonnucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:4713-7.
- 237.** Santos AF, Lengruher RB, Soares EA, Jere A, Sprinz E, Martinez AM, Silveira J, Sion FS, Pathak VK, Soares MA. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One* 2008; 3:e1781.
- 238.** Kemp SD, Shi C, Bloor S, Harrigan PR, Mellors JW, Larder BA. A novel polymorphism at codon 333 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase can facilitate dual resistance to zidovudine and L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol* 1998; 72:5093-8.

- 239.** Nikolenko GN, Palmer S, Maldarelli F, Mellors JW, Coffin JM, Pathak VK. Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2093-8.
- 240.** Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK. A novel molecular mechanism of dual resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* 2010; 84:5238-49.
- 241.** Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res* 2009; 82:115-21.
- 242.** Zelina S, Sheen CW, Radzio J, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 Reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:157-63.
- 243.** Logsdon BC, Vickrey JF, Martin P, Proteasa G, Koepke JI, Terlecky SR, Wawrzak Z, Winters MA, Merigan TC, Kovari LC. Crystal structures of a multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease reveal an expanded active-site cavity. *J Virol* 2004; 78:3123-32.
- 244.** Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, Markowitz M, Chernyavskiy T, Niu P, Lyons N, Hsu A, Granneman GR, Ho DD, Boucher CA, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Med* 1996; 2:760-6.
- 245.** Patick AK, Duran M, Cao Y, Shugarts D, Keller MR, Mazabel E, Knowles M, Champman S, Kuritzkers DR, Markowitz M. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir. *Antimicrobial Agents Chemother* 1998; 42:2637-44.
- 246.** Roberts NA. Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. *AIDS* 1995; 9:S27-32.
- 247.** Craig C, Race E, Sheldon J, Whittaker L, Gilbert S, Moffatt A, Rose J, Dissanayeke S, Chirn GW, Duncan IB, Cammack N. HIV protease genotype and viral sensitivity to HIV protease inhibitors following saquinavir therapy. *Aids* 1998; 12:1611-8.
- 248.** Partaledis J, Yamagushi K, Tisdale M, Blair EE, Falcione C, Maschera B, Myers RE, Pazhanisamy S, Futer O, Cullinan AB, Stuver CM, Byrn RA, Livingston DJ. In vitro selection and characterization of HIV-1 isolates with reduced sensitivity to hydroxyethylamino sulfonamide inhibitors of HIV-1 aspartyl protease. *J Virol* 1995; 69:5228-35.
- 249.** Condra JH, Holder DJ, Schleif WA, Blahy OM, Danovich RM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Laird D, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Yang T, Chodakewitz

JA, Deutsch PJ, Leavitt RY, Massari FE, Mellors JW, Squires KE, Steigbigel RT, Tepller H, Emini EA. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J Virol* 1996; 70:8270-6.

**250.** Erickson JW. The not-so-great escape. *Nature Struct Biol* 1995; 2:523-9.

**251.** Marcelin AG, Masquelier B, Descamps D, Izopet J, Charpentier C, Alloui C, Bouvier-Alias M, Signori-Schmuck A, Montes B, Chaix ML, Amiel C, Santos GD, Ruffault A, Barin F, Peytavin G, Lavignon M, Flandre P, Calvez V. Tipranavir-ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3237-43.

**252.** Hughes CA, Robinson L, Tseng A, MacArthur RD. New antiretroviral drugs: a review of the efficacy, safety, pharmacokinetics, and resistance profile of tipranavir, darunavir, etravirine, rilpivirine, maraviroc, and raltegravir. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10:2445-66.

**253.** Baxter JD, Schapiro JM, Boucher CA, Kohlbrenner VM, Hall DB, Scherer JR and Mayers DL. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol* 2006; 80:10794-801.

**254.** Wang Y, Liu Z, Brunzelle JS, Kovari IA, Dewdney TG, Reiter SJ, Kovari LC. The higher barrier of darunavir and tipranavir resistance for HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412:737-42.

**255.** Koh Y, Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H. Loss of protease dimerization inhibition activity of darunavir is associated with the acquisition of resistance to darunavir by HIV-1. *J Virol* 2011; 85:10079-89.

**256.** Manabu Aoki, Kazuhiko Ide, Matthew L. Danish, Yasuhiro Koh, Hiromi Aoki-Ogata, Hiroaki Mitsuya. Tipranavir-resistant HIV-1 lacks both protease enzymatic inhibition and dimerization inhibition activity. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2011) Feb 27-Mar 2, 2011, Boston, MA, USA. Abstract 601.

**257.** Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, Wolfram J, Richards N, Hanlon MH, Porter DJ, Wrin T, Parkin N, Tisdale M, Furfine E, Petropoulos C, Snowden BW, Kleim JP. Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *J Virol* 2002; 76:7398-406.

**258.** Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, Rovenska M, de Jong D, Chappey C, Goedegebuure IW, Heilek-Snyder G, Dulude D, Cammack N, Brakier-Gingras L, Konvalinka J, Parkin N, Kräusslich HG, Brun-Vezinet F, Boucher CA. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med* 2007; 4:e36.

**259.** Lucie Larrouy, Sidonie Lambert-Niclot, Charlotte Charpentier, Marc Wirden, Christine Katlama, Patrick Yeni, Françoise Burn-Vezinet, Vincent Calvez, Anne-Genvieve Marcelin, Diane Descamps. Positive impact of HIV-1 Gag cleavage site A431V mutation on virological

response to darunavir boosted with ritonavir. 18th Conference *on Retroviruses and Opportunistic Infections* (CROI 2011) Feb 27-Mar 2, 2011, Boston, MA, USA. Abstract 604.

**260.** Malet I, Roquebert B, Dalban C, Wirlden M, Amellal B, Agher R, Simon A, Katlama C, Costagliola D, Calvez V, Marcelin AG. Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients. *J Infect* 2007; 54:367-74.

**261.** Rice P, Craigie R, Davies DR. Retroviral integrases and their cousins. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6:76-83.

**262.** Marcelin AG, Ceccherini-Silberstein F, Perno CF, Calvez V. Resistance to novel drug classes. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4:531-7.

**263.** Mouscadet JF, Delelis O, Marcelin AG, Tchertanov L. Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: A structural perspective. *Drug Resist Updat* 2010; 13:139-50.

**264.** Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M, Petropoulos CJ, Huang W. Loss of raltegravir susceptibility in treated patients is conferred by multiple nonoverlapping genetic pathways [abstract 7]. *Antivir Ther* 2008; 13 (Suppl 3):A9.

**265.** Delelis O, Thierry S, Subra F, Simon F, Malet I, Alloui C, Sayon S, Calvez V, Deprez E, Marcelin AG, Tchertanov L, Mouscadet JF. Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:491-501.

**266.** Lenz JC and Rockstroh JK. S/GSK1349572, a new integrase inhibitor for the treatment of HIV: promises and challenges. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20:537-48.

**267.** Sato A, Seki T, Kobayashi M, Yoshinaga T, Fujiwara T, Underwood M, Garvey E, Johns B. In vitro passage of drug resistant HIV-1 against a next generation integrase inhibitor (INI), S/GSK1349572 [poster No. H-932]. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2009

**268.** Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, Wakasa-Morimoto C, Brown KW, Ferris R, Foster SA, Hazen RJ, Miki S, Suyama-Kagitani A, Kawauchi-Miki S, Taishi T, Kawasuji T, Johns BA, Underwood MR, Garvey EP, Sato A, Fujiwara T. In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:813-21

**269.** Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003; 77:13376-88.

**270.** Meehan CJ, Hedge JA, Robertson DL, McCormack GP, Travers SA. Emergence, dominance, and possible decline of CXCR4 chemokine receptor usage during the course of HIV infection. *J Med Virol* 2010; 82:2004-12.

- 271.** Douek DC. 2003. Disrupting T-cell homeostasis: How HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev* 5:172–177.
- 272.** Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-Central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:111-126.
- 273.** Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23:415-26.
- 274.** Hunt PW, Harrigan PR, Huang W, Bates M, Williamson DW, McCune JM, Price RW, Spudich SS, Lampiris H, Hoh R, Leigler T, Martin JN, Deeks SG. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *J Infect Dis* 2006; 194:926-30.
- 275.** Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, Hirschel B, Tebas P, Raffi F, Trottier B, Bellos N, Saag M, Cooper DA, Westby M, Tawadrous M, Sullivan JF, Ridgway C, Dunne MW, Felstead S, Mayer H, van der Ryst E; MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2 Study Teams. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; 359:1442-55.
- 276.** Farber JM and Berger EA. HIV's response to a CCR5 inhibitor: I'd rather tighten than switch! *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:1749-51.
- 277.** Tsamis F, Gavrilov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, Trkola A, Palani A, Clader JW, Tagat JR, McCombie S, Baroudy B, Moore JP, Sakmar TP, Dragic T. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 2003; 77:5201-5208.
- 278.** Laasko MM, Lee FH, Maggarty B, Agrawal C, Nolan KM, Biscione M, Romano J, Jordan AP, Leslie GJ, Meissner EG, Su L, Hoxie JA, Doms RW. V3 loop truncations in HIV-1 envelope impart resistance to coreceptor inhibitors and enhanced sensitivity to neutralizing antibodies. *PLoS Pathog* 2007; 3:e117.
- 279.** Lin G, Bertolotti-Ciarlet A, Haggarty B, Romano J, Nolan KM, Leslie GJ, Jordan AP, Huang CC, Kwong PD, Doms RW, Hoxie JA. Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *J Virol* 2007; 81:9956-9966.
- 280.** Moore JP, Kuritzkes DR. A pièce de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4:118-24.
- 281.** Lewis M, Mori J, Simpson P, Whitcomb J, Li X, Roberston D, Westby M. Changes in V3 loop sequence associated with failure of maraviroc treatment in patients enrolled in the



MOTIVATE 1 and 2 Trials. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 3-6 February 2008; Abstract 871. Boston, MA, USA.

**282.** Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G, Perros M. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol* 2007; 81:2359-2371

**283.** Tsibris AM, Sagar M, Gulick RM, Su Z, Hughes M, Greaves W, Subramanian M, Flexner C, Giguel F, Leopold KE, Coakley E, Kuritzkes DR. In vivo emergence of vicriviroc resistance in an HIV-1 subtype C-infected subject. *J Virol* 2008; 82:8210-8214.

**284.** Asin Milan O, Chamberland A, Wei Yi, Haidara A, Sylla M, Tremblay CL. Mutations in V4 domain of HIV-1 envelope gene can have a significant impact on the resistance of maraviroc. *Antirral Therapy* 2011; 16 suppl 1:A45.

**285.** Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, Nelson EL, DeMasi R, Cammack N, Salgo MP, Matthews TJ, Greenberg ML. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* 2004; 18:1787-94.

**286.** Marcelin AG and Calvez V. Résistance du VIH aux inhibiteurs d'entrée. *Virologie* 2007, 11 (numéro spécial): 130-4.

**287.** Isaka Y, Miki S, Kawauchi S, Suyama A, Sugimoto H, Adachi A, Miura T, Hayami M, Yoshie O, Fujiwara T, Sato A. A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Arch Virol* 2001; 146:743-55.

**288.** Masquelier B, Lemoigne E, Pellegrin I, Douard D, Sandler B, Fleury HJ. Primary infection with zidovudine-resistant HIV. *N Engl J Med* 1993; 329:1123-4.

**289.** Chan PA and Kantor R. Transmitted drug resistance in nonsubtype B HIV-1 infection. *HIV Ther* 2009; 3:447-465.

**290.** Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther* 2008; 13(Suppl 2):1-13. Excellent overview of the international approach to monitoring TDR in resource-poor settings as presented by the WHO.

**291.** Shet A, Berry L, Mohri H, Mehandru S, Chung C, Kim A, Jean-Pierre P, Hogan C, Simon V, Boden D, Markowitz M. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:439-446.

- 292.** Smith D, Moini N, Pesano R, Cachay E, Aiem H, Lie Y, Richman D, Little S. Clinical utility of HIV standard genotyping among antiretroviralnaive individuals with unknown duration of infection. *Clin Infect Dis* 2007; 44:456-458.
- 293.** Routy JP, Machouf N, Edwardes MD, Brenner BG, Thomas R, Trottier B, Rouleau D, Tremblay CL, Côté P, Baril JG, Remis RS, Sékaly RP, Wainberg MA. Factors associated with a decrease in the prevalence of drug resistance in newly HIV-1 infected individuals in Montreal. *AIDS* 2004; 18:2305-12.
- 294.** HIV/AIDS Epi Updates-July 2010. Chapter 12: Primary HIV Antiretroviral Drugs Resistance in Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/publication/epi/2010/12-eng.php>
- 295.** Blower SM, Aschenbach AN, Kahn JO. Predicting the transmission of drug-resistant HIV: comparing theory with data. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:10-1.
- 296.** Baggaley RF, Garnett GP, Ferguson NM. Modelling the impact of antiretroviral use in resource-poor settings. *PLoS Med* 2006; 3:e124.
- 297.** Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther* 2008;13 (Suppl 2):25-36.
- 298.** Vergne L,Diagbouga S, Kouanfack C, Aghokeng A, Butel C, Laurent C, Noumssi N, Tardy M, Sawadogo A, Drabo J, Hien H, Zekeng L, Delaporte E, Peeters M. HIV-1 drug-resistance mutations among newly diagnosed patients before scaling-up programmes in Burkina Faso and Cameroon. *Antivir Ther* 2006; 11:575-579.
- 299.** Tebit DM, Sangaré L, Tiba F, Saydou Y, Makamtse A, Somlare H, Bado G, Kouliaty BG, Zabsonre I, Yameogo SL, Sathiandee K, Drabo JY, Kräusslich HG. Analysis of the diversity of the HIV-1 pol gene and drug resistance associated changes among drug-naïve patients in Burkina Faso. *J Med Virol* 2009; 81:1691-701.
- 300.** Derache A, Traore O, Koita V, Sylla A, Tubiana R, Simon A, Canestri A, Carcelain G, Katlama C, Calvez V, Cisse M, Marcelin AG. Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. *Antivir Ther* 2007; 12:123-9.
- 301.** Derache A, Maiga AI, Traore O, Akonde A, Cisse M, Jarrousse B, Koita V, Diarra B, Carcelain G, Barin F, Pizzocolo C, Pizarro L, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:456-63.
- 302.** Ouganda Ndembi N, Lyagoba F, Nanteza B, Kushemererwa G, Serwanga J, Katongole-Mbidde E, Grosskurth H, Kaleebu P; Uganda HIV Drug Resistance Working Group. Transmitted antiretroviral drug resistance surveillance among newly HIV type 1-diagnosed women attending an antenatal clinic in Entebbe, Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008 ; 24:889-95.

- 303.** Ndembu N, Hamers RL, Sigaloff KC, Lyagoba F, Magambo B, Nanteza B, Watera C, Kaleebu P, Rinke de Wit TF. Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala. *AIDS* 2011; 25:905-10.
- 304.** Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A, Ekouevi D, Bonard D, Bequet L, Huet C, Chenal H, Rouet F, Dabis F, Lafon ME, Salamon R, Masquelier B, Fleury HJ. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Côte d'Ivoire: ANRS 1257 study. 2003; 19:713-7. 107
- 305.** Toni T, Masquelier B, Minga A, Anglaret X, Danel C, Coulibaly A, Chenal H, Dabis F, Salamon R, Fleury HJ; Primo-CI ANRS 1220 Study Group. HIV-1 antiretroviral drug resistance in recently infected patients in Abidjan, Côte d'Ivoire: A 4-year survey, 2002-2006. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23:1155-60.
- 306.** Huang KH, Goedhals D, Fryer H, van Vuuren C, Katzourakis A, De Oliveira T, Brown H, Cassol S, Seebregts C, McLean A, Klenerman P, Phillips R, Frater J; Bloemfontein-Oxford Collaborative Group. Prevalence of HIV type-1 drug-associated mutations in pre-therapy patients in the Free State, South Africa. *Antivir Ther* 2009; 14:975-84
- 307.** Price MA, Wallis CL, Lakhi S, Karita E, Kamali A, Anzala O, Sanders EJ, Bekker LG, Twesigye R, Hunter E, Kaleebu P, Kayitenkore K, Allen S, Ruzagira E, Mwangome M, Mutua G, Amornkul PN, Stevens G, Pond SL, Schaefer M, Papathanasopoulos MA, Stevens W, Gilmour J; IAVI Early Infection Cohort Study Group. Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27:5-12.
- 308.** Hanson DL, Adjé-Touré C, Talla-Nzussouo N, Eby P, Borget MY, Kouadio LY, Celestin BE, Tossou O, Eholie S, Kadio A, Chorba T, Nkengasong JN. HIV type 1 drug resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25:489-95.
- 309.** Romano L, Venturi G, Giomi S, Pippi L, Valensin PE, Zazzi M. Development and significance of resistance to protease inhibitors in HIV-1-infected adults under tripledrug therapy in clinical practice. *J Med Virol* 2002; 66:143-150.
- 310.** Wood E, Hogg RS, Yip B, Dong W, Wynhoven B, Mo T, Brumme CJ, Montaner JSG, and Harrigan PR: Rates of antiretroviral resistance among HIV-infected patients with and without a history of injection drug use. *AIDS* 2005; 19: 1189-1195.
- 311.** Lima VD, Harrigan PR, Sénécal M, Yip B, Druyts E, Hogg RS, Montaner JS. Epidemiology of antiretroviral multiclass resistance. *Am J Epidemiol* 2010; 172:460-8.
- 312.** Youree BE and D'Aquila RT. Antiretroviral resistance testing for clinical management. *AIDS Rev* 2002; 4:3-12.

- 313.** Halvas EK, Aldrovandi GM, Balfe P, Beck IA, Boltz VF, Coffin JM, Frenkel LM, Hazelwood JD, Johnson VA, Kearney M, Kovacs A, Kuritzkes DR, Metzner KJ, Nissley DV, Nowicki M, Palmer S, Ziermann R, Zhao RY, Jennings CL, Bremer J, Brambilla D, Mellors JW. Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2612-2614.
- 314.** Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, Wantman M, Hammer SM, Palmer S, Vaida F, Coffin JM, Mellors JW. Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 2010; 201:672-80.
- 315.** Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11:31-46.
- 316.** Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007; 17:1195-201.
- 317.** Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, Macarthur RD, Baxter JD, Huang C, Lubeski C, Turenchalk GS, Braverman MS, Desany B, Rothberg JM, Egholm M, Kozal MJ; Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 2009; 199:693-701.
- 318.** Wainberg MA, Moisi D, Oliveira M, Toni TD, Brenner BG. Transmission dynamics of the M184V drug resistance mutation in primary HIV infection. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2346-9.
- 319.** Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, Holguín A. HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res* 2010; 85:409-17.
- 320.** Depatureaux A, Charpentier C, Leoz M, Unal G, Damond F, Kfutwah A, Vessière A, Simon F, Plantier JC. Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 56:139-45
- 321.** Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, Kuritzkes DR, Bennett D. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007; 21:215-23.
- 322.** Arien KK, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:141-51.
- 323.** Eshleman SH, Hoover DR, Chen S, Hudelson SE, Guay LA, Mwatha A, Fiscus SA, Mmiro F, Musoke P, Jackson JB, Kumwenda N, Taha T. Nevirapine (NVP) resistance in women with

HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP. *J Infect Dis* 2005; 192:30-6.

**324.** Marconi VC, Sunpath H, Lu Z, Gordon M, Koranteng-Apegyei K, Hampton J, Carpenter S, Giddy J, Ross D, Holst H, Losina E, Walker BD, Kuritzkes DR; South Africa Resistance Cohort Study Team. Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1589-97.

**325.** Hsu LY, Subramaniam R, Bachelier L, Paton NI. Characterization of mutations in CRF01\_AE virus isolates from antiretroviral treatment-naive and -experienced patients in Singapore. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:5-13.

**326.** Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M, Wainberg MA. 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.

**327.** Turner D, Brenner B, Moisi D, Detorio M, Cesaire R, Kurimura T, Mori H, Essex M, Maayan S, Wainberg MA. Nucleotide and amino acid polymorphisms at drug resistance sites in non-B-subtype variants of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2993-8.

**328.** Chaplin B, Eisen G, Idoko J, Onwujekwe D, Idigbe E, Adewole I, Gashau W, Meloni S, Sarr AD, Sankalé JL, Ekong E, Murphy RL, Kanki P. Impact of HIV type 1 subtype on drug resistance mutations in Nigerian patients failing first-line therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27:71-80.

**329.** Deshpande A, Jauvin V, Magnin N, Pinson P, Faure M, Masquelier B, Aurillac-Lavignolle V, Fleury HJ. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23:335-40.

**330.** Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, Lorber M, Risenberg K, Levi I, Chowers M, Burke M, Bar Yaacov N, Schapiro JM; Israel AIDS Multi-Center Study Group. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS* 2004; 18:909-15.

**331.** Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Snoeck J, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Holguin A, Ariyoshi K, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Vandamme AM, Tanuri A, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2005; 2:e112.

**332.** Novitsky V, Wester CW, DeGruttola V, Bussmann H, Gaseitsiwe S, Thomas A, Moyo S, Musonda R, Van Widenfelt E, Marlink RG, Essex M. The reverse transcriptase 67N 70R 215Y

genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1C-infected adults treated with ZDV/ddI-containing HAART in southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23:868-78.

**333.** Tebit DM, Sangare L, Makamtse A, Yameogo S, Somlare H, Bado G, Kouliaty BG, Sathiandee K, Tiba F, Sanou I, Ouedraogo-Traore R, Zoungrana L, Diallo I, Drabo JY, Krausslich HG: HIV drug resistance pattern among HAART-exposed patients with suboptimal virological response in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 49:17-25.

**334.** Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:785-92.

**335.** Sylla M, Chamberland A, Boileau C, Traoré HA, Ag-Aboubacrine S, Cissé M, Koala S, Drabo J, Diallo I, Niamba P, Tremblay-Sher D, Machouf N, Rashed S, Nickle DC, Nguyen VK and Tremblay CL; ATARAO Group. 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; 13:141-8.

**336.** Doualla-Bell F, Avalos A, Brenner B, Gaolathe T, Mine M, Gaseitsiwe S, Oliveira M, Moisi D, Ndwapi N, Moffat H, Essex M, Wainberg MA. High prevalence of the K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates from infected patients in Botswana treated with didanosine-based regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:4182-5.

**337.** Hosseinipour M, van Oosterhout JJ, Weigel R, Nelson J, Fiscus S, Eron J, Kumwenda J. Resistance profile of patients failing first line ART in Malawi when using clinical and immunologic monitoring. *AIDS 2008 XVII International AIDS Conference: Mexico City, Mexico 2008*. <http://www.aids2008.org/Pag/Abstracts.aspx?SID=256&AID=10688>

**338.** Hawkins CA, Chaplin B, Idoko J, Ekong E, Adewole I, Gashau W, Murphy RL, Kanki P; APIN Plus/Harvard PEPFAR Team. Clinical and genotypic findings in HIV-infected patients with the K65R mutation failing first-line antiretroviral therapy in Nigeria. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 52:228-34

**339.** Gupta RK, Chrystie IL, O'Shea S, Mullen JE, Kulasegaram R, Tong CY. K65R and Y181C are less prevalent in HAART-experienced HIV-1 subtype A patients. *AIDS* 2005; 19:1916-9.

**340.** Coutsinos D, Invernizzi CF, Xu H, Moisi D, Oliveira M, Brenner BG, Wainberg MA. Template usage is responsible for the preferential acquisition of the K65R reverse transcriptase mutation in subtype C variants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2009; 83:2029-33.

- 341.** Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33:336-42.
- 342.** Sukasem C, Churdboonchart V, Sukeepaisarncharoen W, Piroj W, Inwisai T, Tiensuwan M, Chantratita W. Genotypic resistance profiles in antiretroviral-naive HIV-1 infections before and after initiation of first-line HAART: impact of polymorphism on resistance to therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:277-81.
- 343.** Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, Maayan S, Parkin NT, Engelhard D, Lorber M, Istomin V, Shaked Y, Mendelson E, Ram D, Petropoulos CJ, Schapiro JM. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2159-65
- 344.** Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Arruda MB, Gonzalez LMF, Guimaraes JA, Diaz RS, Antunes OAC, Tanuri A. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis* 2005; 191:1961-70.
- 345.** Abecasis AB, Deforche K, Snoeck J, Bachelier LT, McKenna P, Carvalho AP, Gomes P, Camacho RJ, Vandamme AM. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS* 2005; 19:1799-806.
- 346.** Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type-1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331:1173-80.
- 347.** Bennett DE. The requirement for surveillance of HIV drug resistance within antiretroviral rollout in the developing world. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19:607-14.
- 348.** Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, Pellegrin I, Izopet J, Ruffault A, Masquelier B, Meyer L, Rouzioux C, Brun-Vezinet F, Costagliola D. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS* 2003; 17:2635-43.
- 349.** WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach. 2003 revision. Geneva. World Health Organization, 2003. Available at [www.who.int/hiv/pub/prev\\_care/en/arvrevision2003en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/arvrevision2003en.pdf) (accessed 7 June 2004).
- 350.** Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 2002; 288:181-188.
- 351.** Booth CL and Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:1047-1056.

- 352.** Vessièrè A, Nerrienet E, Kfuṭwah A, Menu E, Tejiokem M, Pinson-Recordon P, Barré-Sinoussi F, Fleury H, Ayouba A. HIV-1 pol gene polymorphism and antiretroviral resistance mutations in drug-naïve pregnant women in Yaounde, Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:256-258.
- 353.** Pillay V, Ledwaba J, Hunt G, Rakgotho M, Singh B, Makubalo L, Bennett DE, Puren A, Morris L. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naïve HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther* 2008; 13:101-107.
- 354.** Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Mwamba JK, Tshimpaka J, Kashi M, Mama N, Valéa D, Delaporte E, Lepira F, Peeters M. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:202-6.
- 355.** Somi GR, Kibuka T, Diallo K, Tuhuma T, Bennett DE, Yang C, Kagoma C, Lyamuya EF, Swai RO, Kassim S. Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antivir Ther* 2008; 13 Suppl 2:77-82.
- 356.** Aghokeng AF, Vergne L, Mpoudi-Ngole E, Mbangue M, Deoudje N, Mokondji E, Nambei WS, Peyou-Ndi MM, Moka JJ, Delaporte E, Peeters M. Evaluation of transmitted HIV drug resistance among recently-infected antenatal clinic attendees in four Central African countries. *Antivir Ther* 2009; 14:401-11.
- 357.** Bussmann H, de la Hoz Gomez F, Roels TH, Wester CW, Bodika SM, Moyo S, Taffa N, Anderson MG, Mine M, Bile EC, Yang C, Mphoyakgosi K, Lehotzky EA, Mlotshwa B, Mmelesi M, Seipone K, Makhema MJ, Marlink RG, Novitsky V, Essex M. Prevalence of transmitted HIV drug resistance in Botswana: lessons learned from the HIVDR-Threshold Survey conducted among women presenting for routine antenatal care as part of the 2007 national sentinel survey. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27:365-72.
- 358.** Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, Yokoyama M, Nii-Trebi N, Ugly-Kwame E, Sato H, Ofori-Adjei D, Kurata T, Barre-Sinoussi F, Sata T, Tokunaga K. HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 2005; 41:243-251.
- 359.** Germanaud D, Derache A, Traore M, Madec Y, Toure S, Dicko F, Coulibaly H, Traore M, Sylla M, Calvez V, Marcelin AG. Level of viral load and antiretroviral resistance after 6 months of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor first-line treatment in HIV-1-infected children in Mali. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jan;65(1):118-24.
- 360.** Laurent C, Ngom Gueye NF, Ndour CT, Gueye PM, Diouf M, Diakhaté N, Touré Kane NC, Lanièce I, Ndir A, Vergne L, Ndoye I, Mboup S, Sow PS, Delaporte E; ANRS 1215/1290 Study Group. Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:14-7.



- 361.** Johannessen A, Naman E, Kivuyo SL, Kasubi MJ, Holberg-Petersen M, Matee MI, Gundersen SG and Bruun JN. Virological efficacy and emergence of drug resistance in adults on antiretroviral treatment in rural Tanzania. *BMC Infect Dis* 2009; 9:108-116.
- 362.** Bussmann H, Wester CW, Ndwapi N, Grundmann N, Gaolathe T, Puvimanasinghe J, Avalos A, Mine M, Seipone K, Essex M, Degruittola V, Marlink RG. Five-year outcomes of initial patients treated in Botswana's National Antiretroviral Treatment Program. *AIDS* 2008; 22:2303-11.
- 363.** Nacro B, Zoure E, Hien H, Tamboura H, Rouet F, Ouiminga A, Drabo A, Yameogo S, Hien A, Peyriere H, Mathieu O, Hirt D, Treluyer JM, Nicolas J, Foulongne V, Segondy M, van de Perre P, Diagbouga S, Msellati P. Pharmacology and immuno-virologic efficacy of once-a-day HAART in African HIV-infected children: ANRS 12103 phase II trial. *Bull World Health Organ* 2011; 89:451-8.
- 364.** Barth RE, van der Meer JT, Hoepelman AI, Schrooders PA, van de Vijver DA, Geelen SP, Tempelman HA. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy administered by general practitioners in rural South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:977-84.
- 365.** Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:155-66.
- 366.** Bartlett JA, Fath MJ, Demasi R, Hermes A, Quinn J, Mondou E, Rousseau F. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-infected adults. *AIDS* 2006; 20:2051-2064.
- 367.** Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, Klingman KL, Garren KW, George T, Rooney JF, Brizz B, Lalloo UG, Murphy RL, Swindells S, Havlir D, Mellors JW; AIDS Clinical Trials Group Study A5142 Team. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; 358:2095-2106.
- 368.** Zolfo M, Schapiro JM, Phan V, Koole O, Thai S, Vekemans M, Fransen K, Lynen L. Genotypic Impact of Prolonged Detectable HIV Type 1 RNA Viral Load after HAART Failure in a CRF01\_AE-Infected Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27:727-35.
- 369.** Napravnik S, Edwards D, Stewart P, Stalzer B, Matteson E, Eron JJ Jr. HIV-1 drug resistance evolution among patients on potent combination antiretroviral therapy with detectable viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:34-40.
- 370.** Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, Lima VD, Günthard HF, Gilks C, Pillay D. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:409-17.

- 371.** Reynolds SJ, Kityo C, Mbamanya F, Dewar R, Ssali F, Quinn TC, Mugenyi P, Dybul M. Evolution of drug resistance after virological failure of a first-line highly active antiretroviral therapy regimen in Uganda. *Antivir Ther* 2009; 14:293-7.
- 372.** Konings FA, Zhong P, Agwara M, Agyingi L, Zekeng L, Achkar JM, Ewane L, Saa, Afane Ze E, Kinge T, Nyambi PN. Protease mutations in HIV-1 non-B strains infecting drug-naive villagers in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:105-9.
- 373.** Ait-Khaled M, Stone C, Amphlett G, Clotet B, Staszewski S, Katlama C and Tisdale M; CNA3002 International Study Team. M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. *AIDS* 2002; 16:1686-9.
- 374.** Para MF, Glidden DV, Coombs RW, Collier AC, Condra JH, Craig C, Bassett R, Leavitt R, Snyder S, McAuliffe V and Boucher C. 2000. Baseline human immunodeficiency virus type 1 phenotype, genotype, and RNA response after switching from long-term hard-capsule saquinavir to indinavir or soft-gel-capsule saquinavir in AIDS clinical trials group protocol 333. *J Infect Dis.* 182:733-43.
- 375.** Marcelin AG, Flandre P, de Mendoza C, Roquebert B, Peytavin G, Valer L, Wirden M, Abbas S, Katlama C, Soriano V and Calvez V. Clinical validation of saquinavir/ritonavir genotypic resistance score in protease-inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* 2007; 12:247-52.
- 376.** Marcelin AG, Flandre P, Molina JM, Katlama C, Yeni P, Raffi F, Antoun Z, Ait-Khaled M and Calvez V. Genotypic resistance analysis of the virological response to fosamprenavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients in CONTEXT and TRIAD clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4251-7.
- 377.** Vora S, Marcelin AG, Günthard HF, Flandre P, Hirsch HH, Masquelier B, Zinkernagel A, Peytavin G, Calvez V, Perrin L and Yerly S; Swiss HIV Cohort Study. Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS* 2006; 20:35-40.
- 378.** Garriga C, Pérez-Elías MJ, Delgado R, Ruiz L, Nájera R, Pumarola T, Alonso-Socas Mdel M, García-Bujalance S and Menéndez-Arias L; Spanish Group for the Study of Antiretroviral Drug Resistance. Mutational patterns and correlated amino acid substitutions in the HIV-1 protease after virological failure to nelfinavir- and lopinavir/ritonavir-based treatments. *J Med Virol* 2007; 79:1617-28.
- 379.** Holguín A, Paxinos E, Hertogs K, Womac C, Soriano V. 2004. Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J Clin Virol.* 31:215-20.
- 380.** Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid JF, Boross P, Wang YF, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber IT, Ghosh AK and Mitsuya H.

Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3123-9.

**381.** Delaugerre C, Mathez D, Peytavin G, Berthé H, Long K, Galperine T, de Truchis P. Key amprenavir resistance mutations counteract dramatic efficacy of darunavir in highly experienced patients. *AIDS* 2007; 21: 1210-1213.

**382.** King MS, Rode R, Cohen-Codar I, Calvez V, Marcelin AG, Hanna GJ, Kempf DJ. Predictive genotypic algorithm for virologic response to lopinavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3067-3074.

**383.** Rhee SY, Taylor J, Wadhwa G, Ben-Hur A, Brutlag DL, Shafer RW. Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:17355-17360.

**384.** Zolopa A, Towner W, Butcher D, Wang S, Maa JF, Seekins D. Resistance profile after viral rebound on atazanavir-containing therapy: focus on protease inhibitor-naive subjects in the IMPACT study (BMS AI424-128). *HIVDRW2007*.

**385.** Brehm JH, Koontz D, Meter JD, Pathak V, Sluis-Cremer N, Mellors JW. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 30-azido-30-dideoxythymidine. *J Virol* 2007; 81:7852-7859.

**386.** Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S, Maldarelli F, Fivash MJ Jr, Coffin JM, Pathak VK. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 2:317-322.