



HAL
open science

Etude des variants résistants minoritaires aux antirétroviraux : impact sur la réponse virologique au traitement

Eve Todesco

► **To cite this version:**

Eve Todesco. Etude des variants résistants minoritaires aux antirétroviraux : impact sur la réponse virologique au traitement. Virologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066705 . tel-01392528

HAL Id: tel-01392528

<https://theses.hal.science/tel-01392528v1>

Submitted on 4 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Complexité du vivant

Laboratoire de Virologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière

UMR S 1136 - Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique

ETUDE DES VARIANTS RESISTANTS MINORITAIRES AUX ANTIRETROVIRAUX: IMPACT SUR LA REPOSE VIROLOGIQUE AU TRAITEMENT

Par Eve TODESCO

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité: Virologie

Dirigée par le Dr Anne-Geneviève MARCELIN

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2015

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Pierre-Marie Girard	Président
Madame le Docteur Constance Delaugerre	Rapporteur
Monsieur le Professeur Stéphane Chevaliez	Rapporteur
Madame le Professeur Christine Katlama	Examineur
Madame le Professeur Diane Descamps	Examineur
Madame le Docteur Anne-Geneviève Marcelin	Directeur de thèse

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre-Marie Girard d'avoir accepté de présider mon jury ainsi que Madame le Docteur Constance Delaugerre et Monsieur le Professeur Stéphane Chevaliez d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci à Mesdames les Professeurs Christine Katlama et Diane Descamps pour leur participation au jury.

Je remercie vivement Madame le Docteur Anne-Geneviève Marcelin pour son encadrement chaleureux lors de ce travail, ses nombreux conseils avisés et sa grande disponibilité.

Je remercie également Monsieur le Professeur Vincent Calvez pour son soutien et sa confiance en moi depuis mon arrivée au sein de l'équipe. Merci à Monsieur le Professeur Henri Agut pour l'accueil dans son laboratoire.

Merci à Cathia Soulié et Sidonie Lambert pour leur amitié et à tout le laboratoire qui m'a si bien accepté. Une profonde pensée pour le Professeur Jean-Marie Huraux, dont l'absence nous est si pénible.

Enfin, je remercie ma famille d'être une nouvelle fois présente à mes côtés. Ce sera la dernière thèse, promis! A ma sœur Claire qui poursuit ses études et à mon frère Vincent dont la famille s'agrandit. Une mention toute spéciale pour mes grands-parents : pour leur touchant et infaillible soutien!

...et bien sûr merci à mes formidables amis! A ceux de toujours (Sara, JB, Héroïse) et à Edwige, Alban, Romain, Steph, Tiphaine, Armelle, Marine, Caro et Anne-So: merci pour les souvenirs inoubliables de nos années étudiantes! Et un merci tout particulier pour celui qui me supporte au quotidien! Merci pour ta compréhension.

ABREVIATIONS

ABC	Abacavir
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APV	Amprénavir
ARN	Acide RiboNucléique
ARV	Antirétroviraux
ATP	Adénosine 5' TriPhosphate
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
CRF	"Circulating Recombinant Form"
CV	Charge Virale
DDI	Didanosine
ddNTP	Didésoxyribonucléotides
DRV	Darunavir
DTG	Dolutégravir
D4T	Stavudine
EFV	Efavirenz
ELISA	"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"
ETR	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FPV	Fosamprénavir
FTC	Emtricitabine
GSS	"Genotypic Sensitivity Score"
HAART	"Highly Active Antiretroviral Therapy"
HSH	Hommes ayant des rapports Sexuels avec d'autres Hommes
HTLV	"Human T-Cell Leukemia Virus"
IDV	Indinavir
INNTI	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la TI

INTI	Inhibiteurs Nucléosidiques de la TI
IP	Inhibiteurs de la Protéase
LEDGF	"Lens Epithelial Derived Growth Factor"
LPV	Lopinavir
LTR	"Long Terminal Repeat"
MVC	Maraviroc
NGS	"Next Generation Sequencing"
NVP	Névirapine
PBMC	"Peripheral Blood Mononuclear Cell"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PPI	PyroPhosphate
PrEP	"Pre- Exposure Prophylaxy"
RAL	Raltégravir
RT	"Reverse Transcriptase"
RT-PCR	"Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquise
SIV	"Simian Immunodeficiency Virus"
SNC	Système Nerveux Central
STR	"Single Tablet Regimen"
TAM	"Thymidine Analogue Mutations"
TasP	"Treatment as Preventio"
TDF	Ténofovir
TDR	"Transmitted Drug Resistance"
TI	Transcriptase Inverse
TPV	Tipranavir
T20	Enfuvirtide
UD	Usagés de Drogue
UDS	"UltraDeep Sequencing"
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VRM	Variants Résistants Minoritaires
3TC	Lamivudine

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	1
SOMMAIRE	3
INTRODUCTION	4
I. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	7
1.1 Epidémiologie: situation actuelle, tendances	7
1.2 Structure et génome.....	8
1.3 Variabilité génétique du VIH	12
1.4 Physiopathologie	15
1.5 Diagnostic et suivi immuno-virologique de l'infection.....	22
II. Traitement antirétroviral.....	25
2.1 Prévention de l'infection par le VIH	25
2.2 Généralités, principes actuels	26
2.3 Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs). 29	
2.4 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs).....	32
2.5 Inhibiteurs de la protéase (IPs).....	35
2.6 Inhibiteurs d'entrée	38
- Inhibiteur de fusion	38
- Inhibiteur de CCR5.....	38
- Inhibiteur d'attachement	39
2.7 Inhibiteurs d'intégrase (INIs)	39
2.8 Traitement oral « préventif »	43
2.9 Traitements : autres	44
III. Résistance aux antirétroviraux	45
3.1 Les mutations de résistance	45
3.2 Résistance aux INTIs	46
3.3 Résistance aux INNTIs.....	48
3.4 Résistance aux IPs.....	50
3.5 Résistance aux inhibiteurs de fusion	53
3.6 Résistance aux inhibiteurs de CCR5.....	54
3.7 Résistance aux inhibiteurs d'intégrase	55
3.8 La résistance d'hier à aujourd'hui	56
3.9 Variants minoritaires et résistance aux antirétroviraux.....	58
IV. Tests biologiques détectant la résistance	63
4.1 Les tests phénotypiques	63
4.2 Les tests génotypiques conventionnels.....	64
4.3 Nouvelles techniques de séquençage	67
OBJECTIFS	75
RESULTATS.....	77
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	85
BIBLIOGRAPHIE	91
ANNEXES.....	99
RESUME	127
ABSTRACT	128

INTRODUCTION

La découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1), en 1983, deux ans après la première description clinique du syndrome de l'immunodéficience acquise, revient à Françoise BARRE-SINOUSI, Luc MONTAGNIER, lauréats du Prix Nobel de médecine en 2008, et Jean-Claude CHERMANN. En 1986, un second virus apparenté au premier, le VIH de type 2 (VIH-2), était décrit chez des patients d'Afrique de l'Ouest. En peu de temps, la pandémie liée au VIH se révèle être l'une des plus graves maladies infectieuses de notre siècle, et un véritable défi. Depuis 1981, près de 39 millions de personnes en sont mortes. D'après les derniers chiffres publiés par ONUSIDA, près de 37 millions de personnes vivaient avec ce virus en 2014 dans le monde. Le VIH avait encore tué 1,2 millions d'hommes (dont 150 000 enfants de moins de 15 ans) et 2 millions de personnes avaient été infectées cette année-là¹. L'Afrique subsaharienne représente plus de 65% de la population contaminée. Ce virus pose ainsi un véritable problème mondial de santé, dont les répercussions sont considérables, notamment sur le développement des pays pauvres.

Depuis plus de vingt ans, des recherches intenses ont été menées et ont permis la mise à disposition de puissantes associations d'antirétroviraux à partir de 1996 (trithérapie « hautement active » (HAART : "Highly Active Antiretroviral Therapy")). Ainsi, une diminution très importante du stade sida a été observée dans les pays développés, mais malheureusement 90% des patients infectés par le VIH vivent dans des pays à ressources limitées, dans lesquels l'accès aux soins reste difficile. Néanmoins, ONUSIDA a annoncé en juillet dernier une réjouissante nouvelle: l'objectif des 15 millions de

personnes traitées a été atteint avec succès. Depuis la mise en place d'une riposte mondiale pour enrayer la propagation du virus, 30 millions de nouvelles infections et près de 8 millions de décès liés au sida ont été évités ¹.

L'émergence de la résistance aux antirétroviraux, compromettant leur efficacité thérapeutique et liée à une grande variabilité génétique du virus, est un problème qui est très vite apparu aussi bien dans les pays riches que dans ceux en développement. Avec la mise sur le marché de nouvelles classes d'antirétroviraux et de molécules de seconde génération, ce problème est devenu moins préoccupant pour les pays qui y ont accès. Effectivement, l'arsenal thérapeutique nous permet aujourd'hui de bien maîtriser la réplication virale mais environ 10% des patients restent non contrôlés après 6 mois de traitement en France. La détection des mutations de résistance et la surveillance de la résistance transmise sont essentielles pour traiter au mieux les patients infectés par le VIH. Des techniques nouvelles de séquençage, très sensibles, permettent aujourd'hui de détecter les variants minoritaires de résistance, dont la présence peut être corrélée à l'échec virologique ^{2,3}. Par ailleurs, une problématique nouvelle a surgi: l'inflammation et l'activation immunitaire chronique lors de l'infection par le VIH, responsable de l'épuisement du système immunitaire et de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires. Enfin, malgré les avancées considérables de la recherche, aucun vaccin n'est actuellement utilisable, et aucun traitement ne permet l'élimination définitive du virus de ses réservoirs.

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine reste donc, malgré les progrès thérapeutiques effectués et une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection, un problème de Santé Publique. Les efforts doivent être poursuivis,

notamment en recherche, mais aussi au niveau de l'accès au traitement dans les pays pauvres, déjà nettement amélioré. Le dépistage des patients reste également une priorité.

I. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1.1 Epidémiologie: situation actuelle, tendances

En 1995, l'OMS estimait le nombre de personnes vivant avec le VIH à 20 millions dans le monde. En 2014, ce nombre est estimé à 36.9 millions. Ce nombre continue donc de progresser, compte tenu de l'allongement de la survie et de la survenue de nouvelles infections. La transmission sexuelle, par rapports hétérosexuels, reste le principal mode de transmission. Les continents les plus touchés sont l'Afrique subsaharienne (25.8 millions) et l'Asie (5.0 millions) ¹. Malgré ces chiffres inquiétants, l'épidémie semble se stabiliser. En effet, un meilleur accès au traitement a nettement fait reculer le nombre de décès liés au sida ces dernières années (1.2 millions en 2014 contre 1.7 millions en 2011), et le nombre de nouvelles infections a chuté de 38% depuis 2001. Depuis 2009, le nombre des nouvelles infections parmi les enfants a diminué de 43% dans les 21 pays prioritaires du Plan mondial en Afrique. En Asie, les nouvelles infections à VIH ont diminué de 6% entre 2005 et 2013 et la prévalence reste relativement faible, mais la couverture du traitement est de 33% seulement. En France, deux sous-groupes restent particulièrement touchés: les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH), et les personnes originaires d'Afrique subsaharienne, alors que la réduction de la transmission du VIH se poursuit chez les UD (Usagés de drogue). L'incidence du VIH est de 1% dans la population des HSH, conséquence d'une très forte augmentation des pratiques à risque. On estime à environ 6200 le nombre de découvertes de séropositivité en France en 2013

(2600 dans la population des HSH) ⁴, et à 150 000 le nombre de personnes infectées en France en 2010 ⁵.

1.2 Structure et génome

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appartient à la famille des Retroviridae. Le génome de ce virus, constitué de deux copies d'Acide RiboNucléique (ARN) simple brin, est rétro-transcrit en Acide DésoxyriboNucléique (ADN) bicaténaire grâce à une enzyme virale contenue dans le virion: la transcriptase inverse (TI ou en anglais, RT, "Reverse Transcriptase"). Il appartient au genre *Lentivirus* (sous-famille des Orthoretrovirinae).

La famille des Retroviridae, qui recouvre toute particule virale possédant un génome à ARN monocaténaire et une TI, est classée selon des critères morphologiques, phylogénétiques ou pathogéniques. Selon la pathogénie, on peut regrouper les virus oncogènes, qui sont les plus répandus: ils sont associés à des tumeurs et à des leucémies. Par exemple, dans le genre des *Deltaretrovirus*, les HTLV ("Human T-Cell Leukemia Virus"), identifiés à la fin des années 1970 chez des malades atteints de leucémie T ou de lymphome cutané, sont des virus capables de transformer des lymphocytes T CD4+ *in vitro*. Récemment, deux nouveaux virus, HTLV-3 et HTLV-4, ont été identifiés au Cameroun. Les *Lentivirus*, d'abord décrits chez les ongulés, sont des virus qui provoquent des maladies à évolution lente (pneumonies, désordres neurologiques). Ce genre regroupe les VIH, agents responsables du SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience

Acquise) et des virus animaux (virus du visna, virus des syndromes d'immunodéficience du singe, du chat, du bœuf). Deux types de VIH ont été identifiés à ce jour: le VIH-1, répandu sur l'ensemble des continents, et le VIH-2, présent surtout en Afrique de l'Ouest. Chez les singes, des virus apparentés appelés SIV ("Simian Immunodeficiency Virus") ont été isolés à partir de diverses espèces (macaque rhésus, singe vert, mangabey, mandrill, chimpanzé). Enfin, les virus du genre *Spumavirus* ont été identifiés chez de nombreux mammifères, mais ils ne sont associés à aucune pathologie connue chez l'homme ou l'animal.

Le VIH se présente sous forme de particules sphériques d'un diamètre de 80 à 120 nanomètres, produites par bourgeonnement à la surface des cellules infectées. Ces particules sont constituées d'une enveloppe externe d'origine cellulaire, dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe du virus. Celles-ci comportent une partie interne, la gp41, ou glycoprotéine transmembranaire (TM gp41) et une partie externe, la gp120, ou glycoprotéine d'enveloppe externe (SU gp120), qui s'assemblent en trimères. La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une matrice protéique faite de la p17 (MAp17). La capsid virale, en forme de cône tronqué, est composée majoritairement de p24 (CA). A l'intérieur, entourés de la protéine de nucléocapside p7 (NCp7), se trouvent les deux brins identiques d'ARN, liés de façon covalente en 5'. La raison de cette diploïdie reste inconnue ⁶. La capsid contient également les enzymes indispensables à la réplication virale: la TI, l'intégrase et la protéase (Figure 1A). Concernant la structure du virus, seuls les poids moléculaires des protéines et enzymes diffèrent entre VIH-1 et VIH-2.

Le génome des VIH a une longueur d'environ 9200 nucléotides. Il est coiffé en 5' et polyadéylé en 3'. Ses deux extrémités sont composées de LTR ("Long Terminal Repeat": séquences terminales redondantes), générés par la duplication des séquences U5 et U3 adjacentes lors de la rétrotranscription. Il est constitué de trois régions classiques de structure appelées *gag* ("*group antigen specific*"), *pol* ("*polymerase gene*") et *env* ("*envelope gene*"), qui codent respectivement pour les antigènes de matrice et capsid, pour les enzymes nécessaires à la réplication virale et pour les protéines de surface du virion. Par ailleurs, il comporte au moins six gènes de régulation de la multiplication virale, dénommés *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* ou *vpx* et *nef*, et dont les fonctions exactes ne sont toujours pas bien connues (Figure 1B). Pour exploiter au maximum les possibilités d'informations du génome, trois cadres de lecture sont utilisés et certains gènes fonctionnent avec un épissage des ARN messagers, notamment *tat* et *rev*. D'autre part, certains gènes s'expriment sous forme de précurseurs polypeptidiques secondairement clivés; il en est ainsi de *gag* et *pol* d'un côté, et de gp120 et gp41 de l'autre⁷. L'homologie globale entre VIH-1 et VIH-2 est de l'ordre de 50% (élevée au niveau des protéines internes, plus faible au niveau des glycoprotéines d'enveloppe).

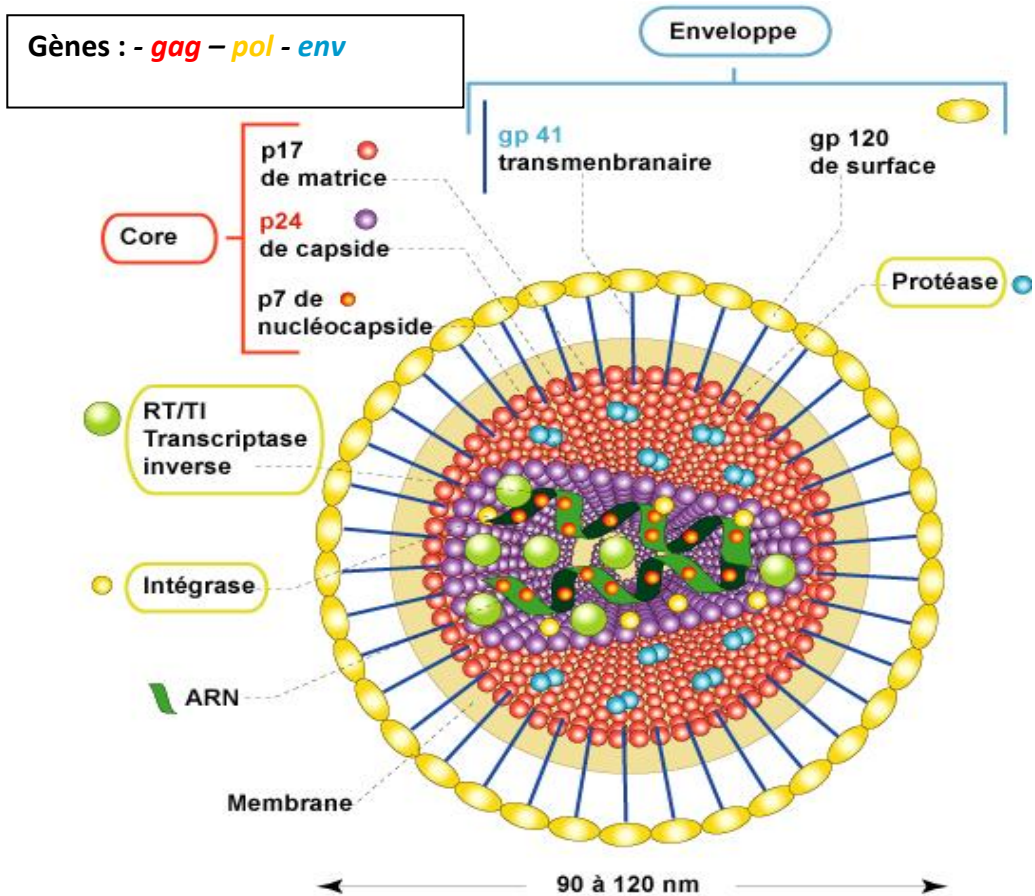


Figure 1. A: Structure du VIH (Pr Huraux, *Traité de Virologie médicale*)

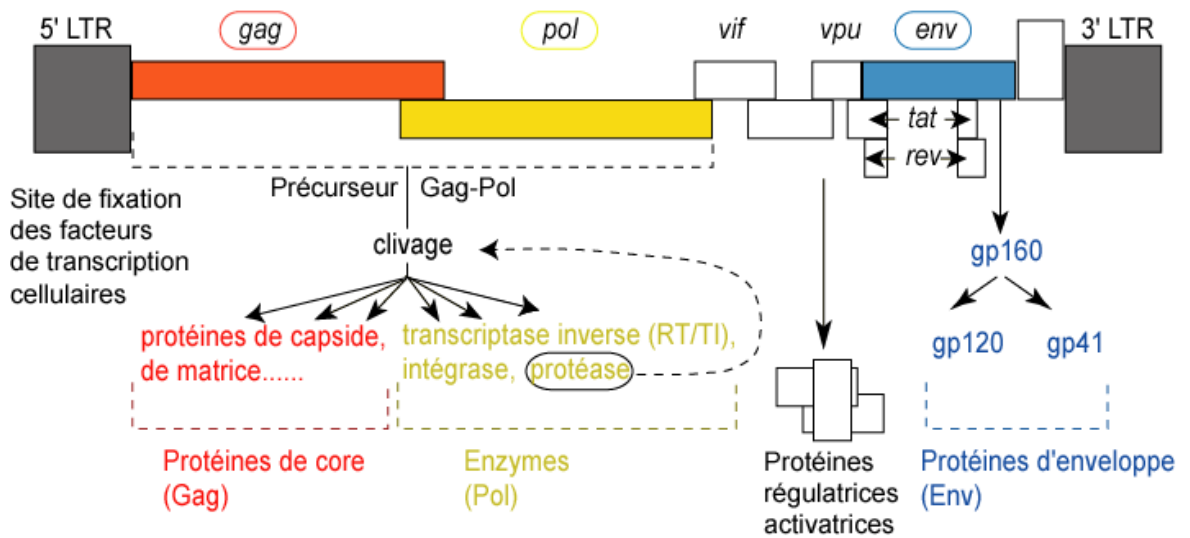


Figure 1. B: Génome du VIH (Pr Huraux, *Traité de Virologie médicale*)

1.3 Variabilité génétique du VIH

- Le VIH-1 est classé en trois groupes distincts. La plupart des HIV-1 appartiennent au groupe M (*'Main'*), qui est composé de 9 sous-types (A à D, F à H, J et K), variant génétiquement de 25 à 35% selon les sous-types et en fonction de la région du génome analysée⁸. Des variations de 15 à 20% existent également au sein des sous-types⁹. Le sous-type C est largement prédominant au niveau mondial (> 50%, sud et est de l'Afrique). Le sous-type A touche l'est de l'Europe, l'Afrique de l'ouest, de l'est et centrale. En France, comme dans le reste de l'Europe et en Amérique du Nord, c'est le sous-type B qui prédomine, mais la circulation d'autres sous-types et de virus recombinants est de plus en plus importante (43% des nouveaux cas en 2013), majoritairement représentés par un recombinant des sous-types A et G, le CRF_02AG ("Circulating Recombinant Form"; Figure 2)). Les CRF proviennent de phénomènes de recombinaison génétique chez des sujets co-infectés par des sous-types distincts¹⁰. Plus de 70 CRF ont été décrits à ce jour. La TI peut effectivement "sauter" d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la rétrotranscription¹¹.

Le groupe O (*'Outlier'*) et le groupe N (non-M, non-O) ont été retrouvés au Cameroun et au Gabon, et sont beaucoup plus rares. En 2009, chez une patiente camerounaise, un nouveau variant VIH-1, dérivant d'un SIV de gorille, a été identifié et classé dans un nouveau groupe: P¹².

- Le VIH-2 est classé en huit groupes distincts (A à H). Un seul CRF (CRF_01AB) a été décrit¹³.

- Un lien étroit de parenté génétique entre les groupes N et M du VIH-1 et les SIV de chimpanzés et de gorilles indique que des événements d'anthropozoonose, par blessures ou morsures par exemple, seraient à l'origine de l'infection VIH-1. Les VIH-2 dérivent probablement d'une introduction chez l'homme d'un SIV de mangabey¹⁴. Ces virus ne sont d'ailleurs pas pathogènes chez leur hôte naturel.

- En plus des phénomènes de recombinaison, il existe une diversité génétique due à l'infidélité de la TI lors de la réplication virale. Ces erreurs d'appariements de nucléotides font apparaître progressivement des variants au sein du même individu infecté: c'est ce que l'on appelle une « quasi-espèce ». Notons que la TI effectue environ une erreur pour 10 000 bases, soit une mutation par nouveau virion, sachant que chez une personne non traitée, 10 milliards de virions peuvent être synthétisés par jour. En effet, cette enzyme ne possède pas d'activité exonucléase 3' vers 5'. Même si de nombreux virions mutés seront défectifs, certaines mutations vont apporter un avantage au virus. D'autres mécanismes de variabilité génétique impliquent des protéines accessoires du VIH (interaction Vif-APOBEC3 par exemple).

La variabilité n'est pas identique tout au long du génome: *gag* et *pol* sont relativement conservés tandis qu'*env* est plus variable. A l'intérieur de la gp120, on distingue des régions hypervariables, dont la boucle V3 qui intervient dans la fixation du virus à ses corécepteurs.

Ces phénomènes de variabilité génétique constituent l'obstacle majeur à l'élaboration d'un vaccin efficace. Ils donnent au virus une capacité considérable d'adaptation lors de pressions de sélection, que ce soit par le système immunitaire ou par

un traitement, permettant la sélection de mutants résistants aux antirétroviraux (Figure 3).

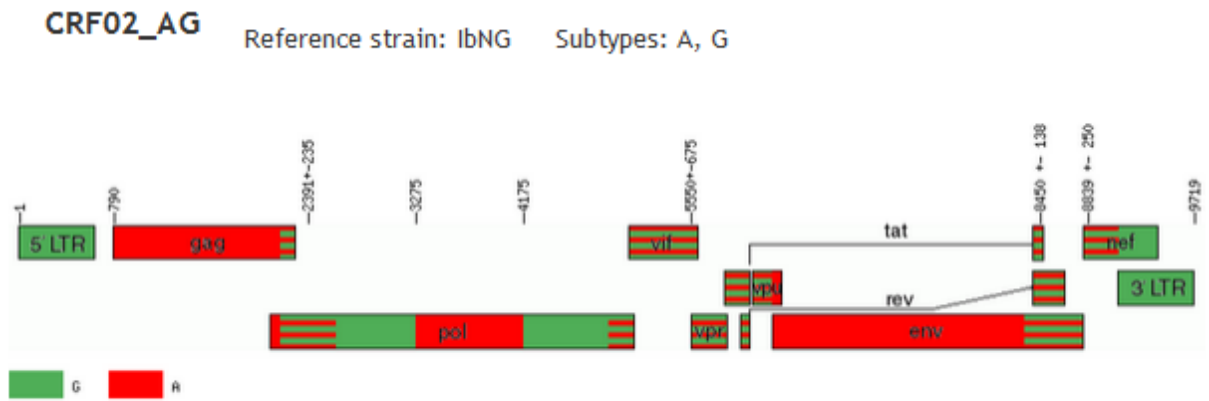


Figure 2: Structure génomique du CRF02_AG (<http://www.hiv.lanl.gov>)

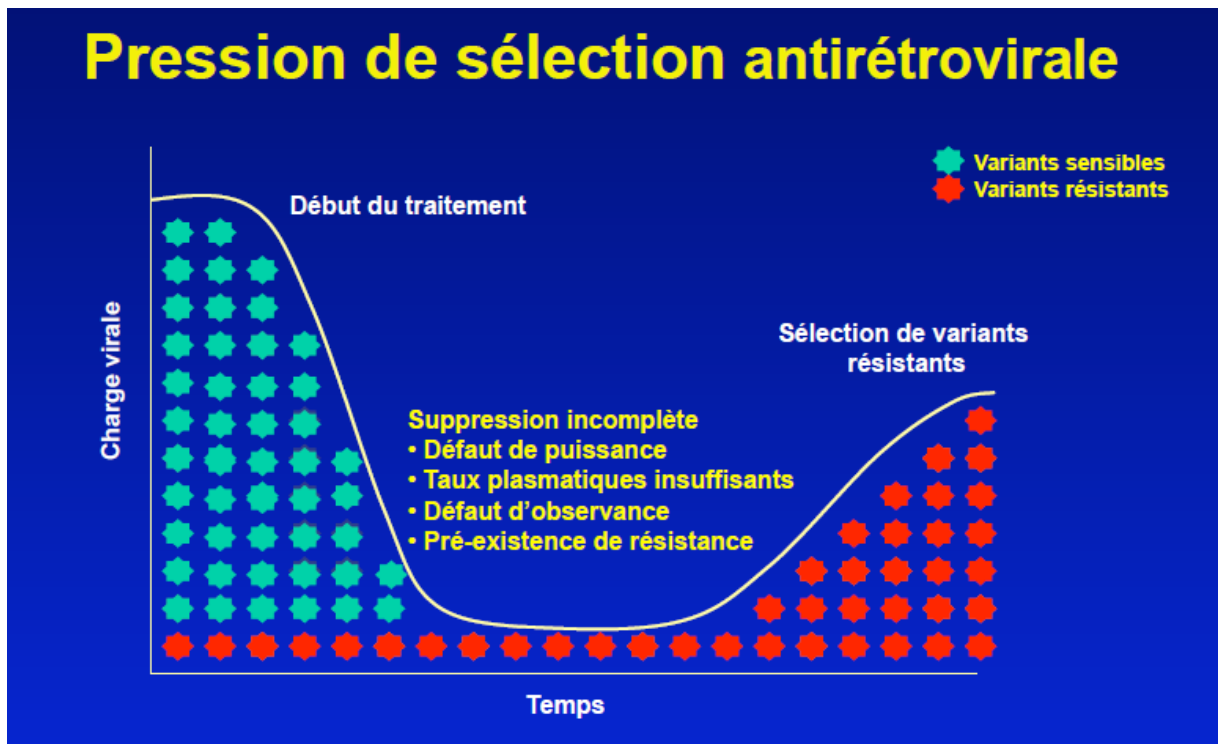


Figure 3: Sélection de variants résistants sous pression antirétrovirale

1.4 Physiopathologie

Cellules cibles et réservoir viral

Dès 1983, les lymphocytes T CD4+ étaient reconnus comme les cellules cibles du VIH qui les détruisait *in vitro*¹⁵. Mais la molécule CD4 est aussi exprimée à la surface d'autres cellules, à un moindre degré mais de façon significative: il s'agit des cellules présentatrices d'antigènes (monocytes sanguins, macrophages tissulaires dont les cellules microgliales du système nerveux central (SNC), cellules dendritiques dont les cellules de Langerhans du tissu cutané). Ces cellules sont présentes dans le thymus, la peau, les muqueuses, les organes lymphoïdes, le SNC et le sang périphérique. Il a été également démontré qu'une molécule de surface (DC-SIGN) exprimée sur les cellules dendritiques est capable de lier le VIH et de le transmettre aux lymphocytes T CD4+¹⁶. La grande majorité de la réplication virale (99%) a lieu dans les cellules CD4+ activées des organes lymphoïdes, libérant dans le plasma des virions dont la demi-vie est estimée à quelques heures.

L'infection virale a sur les lymphocytes T CD4+ un effet létal, or les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (T "helper") ont un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8+. Pendant plusieurs années, les lymphocytes T CD4+ progressivement détruits par le virus sont renouvelés, jusqu'à ce que l'épuisement des organes lymphoïdes centraux (thymus), ne permette plus une régénération efficace. Les organes lymphoïdes constituent le réservoir majeur du virus. En effet, l'infection s'acquiert majoritairement par voie sexuelle au niveau des muqueuses. Lorsque le virus a franchi la barrière épithéliale, il infecte les cellules cibles muqueuses présentes et ces dernières vont migrer jusqu'aux structures lymphoïdes¹⁷. L'atteinte et la dissémination du

virus dans ces structures conduisent à la destruction progressive de celles-ci, et ceci dès le début de l'infection. Cela se traduit par une infiltration de lymphocytes CD8+ dans les centres germinatifs et par une accumulation de lymphocytes B, à l'origine de l'hyperplasie folliculaire observée. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses du système digestif est la principale cible touchée. D'autres tissus comme la rate et le thymus sont également atteints.

La notion de réservoir est importante, puisqu'elle empêche la guérison. Effectivement, le virus persiste sous forme d'ADN proviral dans les cellules CD4+ non activées, essentiellement les cellules mémoire du sang périphérique et des tissus. On sait que cette phase silencieuse de latence permet au virus de rester inaccessible au système immunitaire et aux molécules antirétrovirales. De plus, chez des patients traités efficacement, une virémie résiduelle, basse, peu être détectée, dont les séquences sont souvent différentes de celles retrouvées dans le compartiment plasmatique précédemment, suggérant l'existence de différentes sources productrices de virus. Cette virémie résiduelle apparaît insensible à l'intensification du traitement ¹⁸.

La nature des indispensables corécepteurs coopérant avec la molécule CD4 pour permettre l'entrée du virus est variable ¹⁹. Schématiquement, les virus à tropisme macrophagique (90% des transmissions sexuelles du VIH) utilisent le corécepteur CCR5 (tropisme R5). En revanche, les virus à tropisme T, plus virulents, dépendent du corécepteur CXCR4 (tropisme X4). Différentes études ont montré que les virus X4 ou mixtes (R5X4) sont rares dans les stades précoces de l'infection, mais qu'ils vont émerger durant l'évolution de la maladie chez 50% des patients ²⁰.

Cycle de réplication

L'entrée du virus dans la cellule commence par l'attachement des particules virales sur la cellule cible. Cet attachement se fait par une interaction très forte entre la glycoprotéine gp120 et son récepteur spécifique, la molécule CD4 (Figure 4). Il a été montré que le premier domaine extracellulaire (domaine V1) de cette molécule possède une forte affinité pour la partie C terminale de la gp120. Cette liaison entraîne un changement conformationnel de la gp120 qui permet à une région spécifique, la boucle V3, de se fixer à la surface de la membrane cellulaire sur les corécepteurs (CCR5 ou CXCR4), dont le rôle naturel est de reconnaître des chimiokines. En effet, la reconnaissance de la molécule CD4 n'est pas suffisante et l'attachement du VIH exige un de ces corécepteurs. Il résulte de ces interactions un dégagement et un arrimage de la gp41 dans la membrane cytoplasmique. Le raccourcissement de la gp41 entraîne ensuite le contact entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire avec, au niveau de la gp41, un phénomène de fusion-lyse qui permet l'introduction de la capsid virale et de son contenu dans le cytoplasme.

L'ARN viral, associé à des protéines de capsid, va être immédiatement rétro-transcrit dans le cytoplasme en ADN double brin par la TI. Cette enzyme assure également l'hydrolyse de la matrice d'ARN. La TI doit donc, de façon répétée, s'attacher et se détacher de l'ADN et de l'ARN viral, avec un risque d'erreur par « dérapage » à chaque rattachement. L'ADN double brin, dont les extrémités ont été préparées par l'intégrase, migre ensuite dans le noyau, sous la forme d'un complexe de pré-intégration formé par l'intégrase et des protéines virales dont Vpr. L'ADN peut alors s'intégrer au hasard dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte par ses deux extrémités LTR grâce à l'intégrase

qui agit sous forme de dimères, et est stabilisée par la protéine LEDGF ("Lens Epithelial Derived Growth Factor")²¹. Il prend alors le nom d'ADN proviral.

Après cette phase dite précoce, la phase tardive va conduire à la libération de nouveaux virus par la cellule sous le contrôle de facteurs cellulaires et de protéines de régulation du virus. Le virus utilise alors la machinerie cellulaire pour se répliquer : la transcription de l'ADN proviral en ARN génomique est en effet assurée par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Certains facteurs cellulaires présents dans le noyau quand la cellule est stimulée, comme NFκB, vont interagir avec le promoteur de la transcription à l'extrémité 5' (LTR 5'). Deux protéines virales interviennent également : Tat va contrôler l'élongation en se fixant à proximité du LTR, et Rev va réguler le transport de l'ARN génomique vers le cytoplasme⁶. La protéine Tat peut stimuler cette synthèse par un facteur 50. Le rôle des autres facteurs viraux régulant la transcription est moins bien connu. Une fois dans le cytoplasme, l'ARN messager va être épissé en différents ARN messagers viraux de différentes tailles codant pour les polyprotéines Env ou Gag-Pol et pour les protéines de régulation. La polyprotéine Env est clivée par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe qui seront glycosylées par les enzymes de la cellule. Les protéines virales Vpu et Vif interviennent dans l'assemblage des protéines virales et de l'ARN viral au niveau de la membrane cellulaire. Quand à la polyprotéine Gag-Pol, c'est au moment du bourgeonnement du virus hors de la cellule qu'elle va être scindée par la protéase virale pour donner les protéines constitutives internes du virus et ses trois enzymes. Cette dernière étape s'appelle la maturation et est indispensable à la production de virus infectieux (figure 4).

Ces dernières années ont été marquées par la découverte de facteurs de restriction cellulaires capables de limiter la réplication des VIH/SIV après leur entrée dans la cellule-hôte. APOBEC3F et 3G provoquent effectivement une hyper-mutation lors de la synthèse de l'ADN viral au cours de la rétrotranscription. Ce phénomène peut aboutir à la création de codons stop ²². L'activité de ces facteurs APOBEC3 est cependant neutralisée par la protéine de régulation Vif du virus, qui se fixe à APOBEC3 et entraîne sa dégradation. Il semble que certains virus partiellement défectifs en Vif, de moindre affinité pour APOBEC3, permettent un échappement thérapeutique sous pression de sélection, par une augmentation du taux de mutations de G vers A ²³. La découverte de ces mécanismes de défense naturelle des cellules hôtes contre l'infection ouvre de nouvelles voies de recherche.

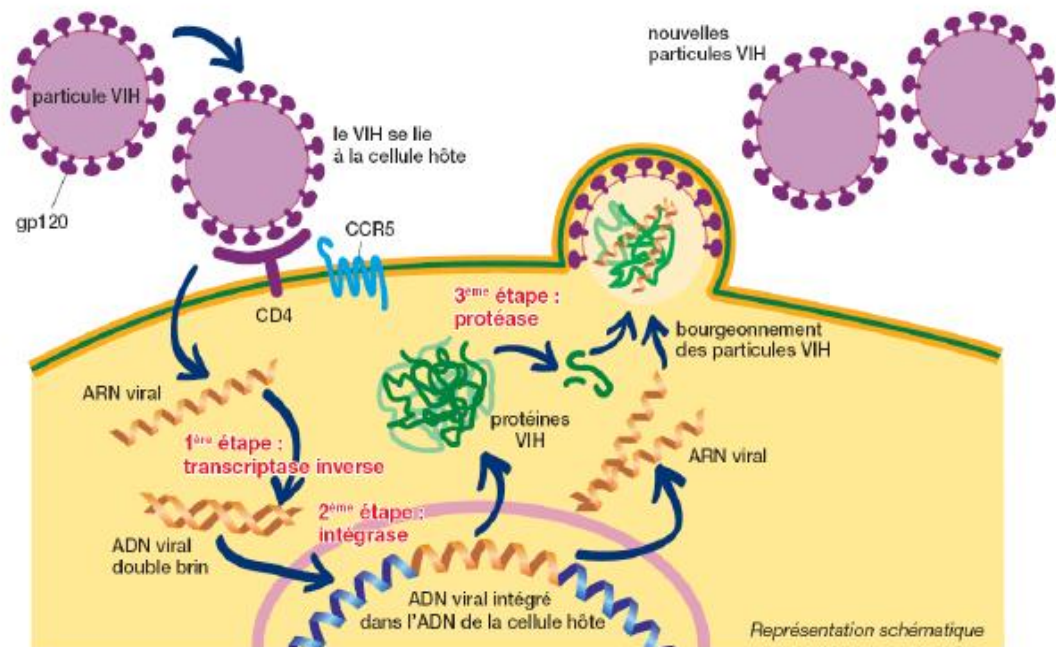


Figure 4: Cycle de réplication du VIH

Histoire naturelle de la maladie

Après exposition au virus, la phase aiguë ou primo-infection s'accompagne d'une réplication virale intense, d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+ et bien sûr d'une diminution du nombre de lymphocytes T CD4+. La recherche dans le plasma de l'ARN viral puis de l'antigène p24, marqueurs précoces de la présence virale, est positive au bout de 10 et 15 jours en moyenne. Cette phase dure quelques semaines, et est symptomatique une fois sur deux environ (fièvre, adénopathies, éruptions, méningite, voire encéphalite). Un syndrome mononucléosique peut être le signe d'une primo-infection au VIH. Cette virémie massive, comparable à celle des stades ultimes de la maladie, entraîne une large dissémination du VIH dans les organes lymphoïdes et le SNC.

Au décours de la phase aiguë, la réponse immune vis-à-vis du virus permet de contrôler partiellement et pour une durée de plusieurs années la réplication virale : c'est la phase dite de latence clinique, pendant laquelle la réplication virale semble stable, ainsi que le nombre de lymphocyte T CD4+. Les signes cliniques de primo-infection ont disparu. Durant les trois phases de la maladie, il n'y a en fait jamais de latence virale. Il ne s'agit effectivement que d'une stabilité apparente car la réplication virale est particulièrement active dans les tissus lymphoïdes et de nombreuses cellules CD4+ sont détruites chaque jour (environ 1 milliard) mais rapidement remplacées par l'organisme.

Puis le virus va prendre le dessus sur le système immunitaire épuisé et, en phase tardive de l'infection, surviendront une augmentation de la charge virale plasmatique et la chute du nombre de lymphocytes T CD4+. En effet, l'établissement précoce de réservoirs viraux et la réplication constante du virus *in vivo* permettent l'émergence de variants viraux capables d'échapper au système immunitaire. La charge virale élevée entraîne la

disparition progressive des lymphocytes T CD4+ par des mécanismes directs (effet cytopathogène du virus) ou indirects (lyse par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, apoptose...). Après quelques années, l'altération des organes lymphoïdes centraux ne permet plus le renouvellement des lymphocytes T CD4+. L'évolution se fait inexorablement vers un déficit immunitaire profond. L'antigène p24 réapparaît, avec un titre à nouveau élevé de virus dans le plasma, et en miroir une baisse des anticorps anti-p24. Avec l'entrée dans le stade SIDA, en moyenne après 10 ans d'évolution et une chute des CD4 en-dessous de $200/\text{mm}^3$, surviennent les infections opportunistes, les néoplasies (maladie de Kaposi, lymphome B), ou l'encéphalite à VIH (figure 5).

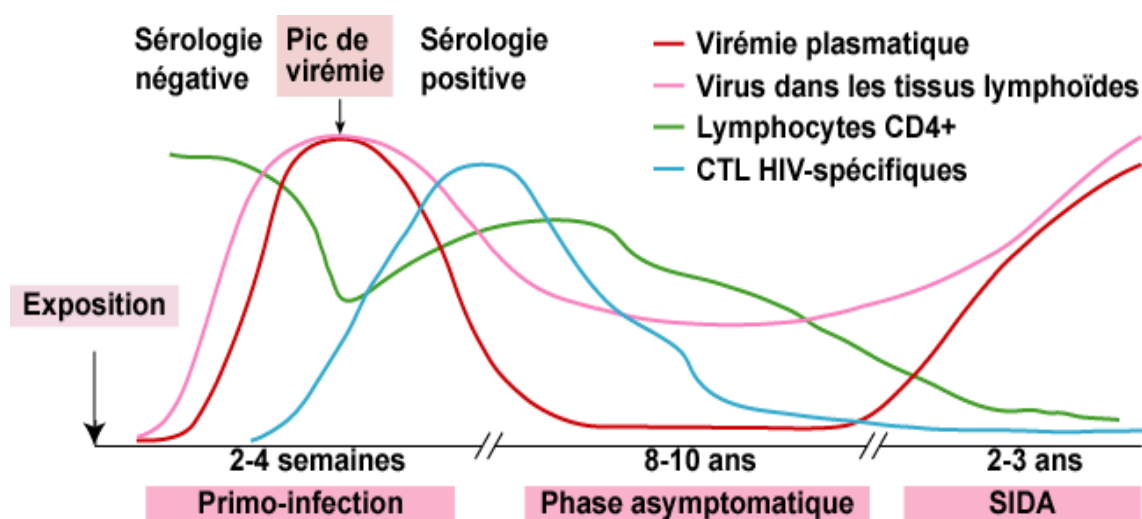


Figure 5: Histoire naturelle de l'infection par VIH-1 (Pr Huraux, *Traité de Virologie médicale*)

Un autre processus délétère rentre également en jeu même lorsque la charge virale semble maîtrisée par les traitements : l'inflammation et l'activation immunitaire chronique, responsables de l'épuisement du système immunitaire et de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires. Plusieurs causes sont évoquées : la translocation de bactéries d'origine digestive, la production de protéines virales activatrices du système

immunitaire (gp120, Nef), la réplication virale même résiduelle du VIH et la réplication d'autres virus comme le CMV ²⁴. La première de ces causes serait importante. La translocation proviendrait d'une perte de l'intégrité de la muqueuse causée par l'important déficit en cellules CD4+ à ce niveau dans les premières semaines de l'infection puis à l'auto-entretien du cycle inflammatoire ²⁵.

1.5 Diagnostic et suivi immuno-virologique de l'infection

Les méthodes de dépistage de référence sont actuellement les méthodes immuno-enzymatiques de type "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA) combiné de 4^e génération. La majorité des trousse détecte les IgM et IgG anti-VIH-1/2 à l'aide d'antigènes qui sont des protéines recombinantes. La détection supplémentaire de l'antigène p24 dans ces tests permet un dépistage plus précoce de quelques jours au cours de la primo-infection (environ trois semaines après la transmission du virus). Plus de 5 millions de sérologies VIH sont effectuées chaque année en France.

On peut également effectuer une recherche isolée de l'antigène p24 (positive en 15 jours) ou du génome viral dans le plasma (positive en 10 jours) en cas de suspicion de primo-infection (Figure 6). Les tests dits « rapides » sont facilement réalisables mais n'ont pas le même niveau de sensibilité que les tests ELISA combinés au cours de la phase aiguë. Ces tests font appel à une agglutination ou à une adsorption du complexe antigène-anticorps sur une membrane, suivie d'une coloration visible à l'œil nu.

De part le risque de faux positifs avec ces tests (facteurs rhumatoïdes, anticorps antinucléaires), une technique de confirmation est nécessaire en cas de positivité ou de doute. La technique de référence est le Western-Blot: des protéines virales sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose. La présence d'anticorps contre une protéine donnée est révélée par une réaction immuno-enzymatique, qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. Les critères de positivité sont ceux de l'OMS et consistent en la présence d'anticorps dirigés contre au moins deux des glycoprotéines d'enveloppe pour le VIH-1, et d'anticorps dirigés contre au moins une glycoprotéine d'enveloppe, une protéine codée par *gag* et une protéine codée par *pol* pour le VIH-2. Un des intérêts de ce test est de soupçonner des cas de primo-infection sur la base de profils incomplets, notamment lorsqu'est observée une réactivité contre les protéines gp160 et p24. Toute positivité sur ce premier test de confirmation doit être confirmée sur un second prélèvement de sérum pour s'affranchir d'un problème d'identité et poser définitivement le diagnostic d'infection par le VIH.

La mesure de la charge virale plasmatique (CV) par amplification génique (RT-PCR en temps réel: "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction") permet d'évaluer et de suivre la réplication du virus, en nombre de copies d'ARN viral par millilitre de plasma. Une variation est significative si elle atteint un facteur 3 ($0.5 \log_{10}$). Il est recommandé de suivre un patient avec la même technique de CV, et si possible dans le même laboratoire. Le deuxième paramètre clef du suivi de l'infection par le VIH est le nombre de lymphocytes T CD4+, reflet de l'état immunitaire du patient.

L'amplification de l'ADN proviral par PCR consiste à mettre en évidence le génome viral dans la cellule. La recherche de l'ADN proviral, ajoutée à la mesure de la CV plasmatique, se révèle utile pour le diagnostic de l'infection de l'enfant né de mère séropositive, pour exclure la contamination de celui-ci. Actuellement, la culture virale (sur cellules MT2, Sup T1) n'est effectuée qu'à des fins de recherche. Elle peut rester intéressante en cas de virus variants non reconnus par les techniques moléculaires.

D'autre part, l'étude de la résistance aux antirétroviraux, que nous aborderons un peu plus loin, se fait par amplification génique des gènes de la TI, de la protéase, de l'intégrase et de la gp41 (cibles de la thérapeutique antirétrovirale). Les mutations sont détectées en comparant les séquences virales d'un patient donné à des séquences de référence. Le tropisme viral est lui aussi étudié par cette technique, par séquençage de la boucle V3 de la gp120.

MARQUEURS VIRAUX AU COURS DE LA PRIMO-INFECTION PAR HIV-1, SANS TRAITEMENT
(Groupe de travail sur le diagnostic précoce, rapport au Directeur Général de la Santé, 1997)

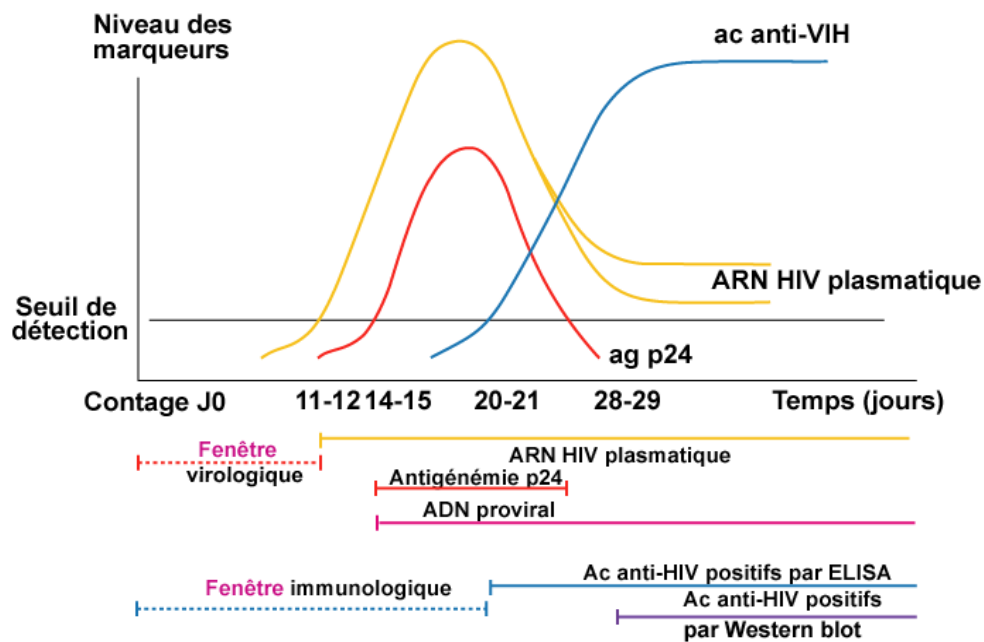


Figure 6: Evolution des marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par le VIH

(Pr Huraux, *Traité de Virologie médicale*)

II. Traitement antirétroviral

2.1 Prévention de l'infection par le VIH

L'usage du préservatif reste en matière de prévention la référence, les conduites sexuelles à risque ainsi qu'un nombre élevé de partenaires sexuels étant évidemment les principaux facteurs de risque. Par ailleurs, en mars 2007, l'OMS a déclaré que la circoncision devait maintenant être reconnue comme une mesure efficace de prévention de l'infection par le VIH, trois essais randomisés ayant montré une réduction du risque d'infection par le VIH chez les hommes circoncis de l'ordre de 50 % à 60 % dans le cadre de rapports hétérosexuels. Les modèles estiment que la circoncision pourrait réduire d'environ deux millions le nombre de nouvelles infections lors des dix prochaines années

26 .

Le traitement des personnes contaminées (TasP: "Treatment as Prevention") constitue un moyen de réduction de la transmission efficace. Un traitement « préventif » (PrEP: "Pre Exposure Prophylaxy"), lorsqu'une personne séronégative a une conduite particulièrement à risque ou dans les couples sérodiscordants, limite également les risques de contamination. Ce concept est détaillé un peu plus loin (2.9 Traitement oral «préventif »).

Enfin, il ne faut pas oublier de citer comme autres moyens de prévention l'emploi de matériel à usage unique, la lutte contre la transmission mère-enfant ou encore la prophylaxie post-exposition d'une personne séronégative. Le dépistage est

également un moyen de prévention indirect, puisque 60% des transmissions sexuelles se feraient par des personnes ne connaissant pas leur séropositivité ²⁷.

2.2 Généralités, principes actuels

La connaissance du cycle de réplication du VIH a permis de fournir de nombreuses cibles pour le développement d'agents antirétroviraux. Ainsi la transcriptase inverse (TI), la protéase puis, plus récemment, la gp41 et l'intégrase, sont les cibles virales des molécules actuellement sur le marché. Les inhibiteurs de corécepteur CCR5 ont la particularité d'avoir pour cible la cellule humaine. Le premier antirétroviral utilisé en monothérapie fut la zidovudine (AZT ou ZDV, RETROVIR®), un inhibiteur nucléosidique de la TI (INTI). Puis d'autres molécules de la même classe sont apparues et ont permis, en les combinant, d'atteindre une meilleure efficacité. A partir de 1996, est né, avec l'arrivée des inhibiteurs de protéase (IP) et des inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI), le concept de trithérapie qui combine deux INTI et un IP. Ces associations appelées HAART ont montré une efficacité considérable.

L'objectif du traitement antirétroviral est de diminuer la morbidité et la mortalité en préservant le système immunitaire, ce qui implique la réduction de la réplication virale. En effet, nous avons vu que la destruction continue des lymphocytes T CD4+ induit l'épuisement progressif des capacités de renouvellement du système immunitaire. La suppression de cette réplication est par conséquent associée à une restauration progressive des fonctions immunitaires, évaluée en pratique par l'augmentation des

lymphocytes T CD4+. Dans la cohorte COHERE, il a été montré que la mortalité des hommes ayant un taux de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500/mm³ depuis plus de trois ans est comparable à celle des hommes de la population générale²⁸. D'autre part, l'effet délétère de l'inflammation chronique et de l'activation immunitaire permanente sur des organes tels que le cœur, le rein, l'os et le SNC, est désormais connu. Le bénéfice sur la mortalité ou la progression clinique a ainsi été démontré chez les personnes ayant moins 500/mm³ lymphocytes T CD4+, mais également chez les personnes ayant plus 500/mm³ lymphocytes T CD4+ (essai Start²⁹). Il est maintenant recommandé de commencer un traitement antirétroviral le plus tôt possible en France³⁰.

Il est par ailleurs primordial de prévenir l'apparition de mutations de résistance en réduisant la réplication virale au maximum, afin de préserver les options thérapeutiques dans le temps. Les recommandations françaises actuelles préconisent une charge virale < 50 copies/ml sous traitement antirétroviral.

En France, la thérapie antirétrovirale de première ligne suit les recommandations décrites dans le tableau 1^{27,31}. Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de stratégie d'immunothérapie utilisable, malgré plus d'une décennie de recherche dans ce domaine.

L'OMS recommande une trithérapie contenant 2 INTIs et 1 INNTI, les IPs étant réservés aux situations d'échec thérapeutique (sauf patients infectés par le VIH-1 groupe O et enfants).

Plus d'une vingtaine d'antirétroviraux constituent actuellement l'arsenal thérapeutique dans les pays industrialisés. Ils sont de plus en plus administrés en une seule prise par jour, et avec un nombre considérablement réduit de gélules ou de

comprimés, tout en étant souvent mieux tolérés et plus efficaces. La tolérance du traitement et plus largement la qualité de vie du patient sont actuellement des éléments indissociables de la prise en charge du malade.

Tableau 1: Choix préférentiels pour un premier traitement antirétroviral (Actualisations 2014 du rapport Morlat 2013)

CHOIX PREFERENTIELS		
2 INTIs	INNTI	Commentaires
TDF/FTC 245/200mgX1	RPV 25mgX1	Si CV < 5log copies/mL
TDF/FTC 245/200mgX1	EFV 600mgX1	EFV CI chez la femme enceinte
ABC/3TC 600/300mgX1	EFV 600mgX1	Si CV < 5log copies/mL et HLA-B*5701 négatif EFV CI chez la femme enceinte
2 INTIs	IP/r	Commentaires
TDF/FTC 245/200mgX1	DRV/r 800/100mgX1	
ABC/3TC 600/300mgX1	ATV/r 300/100mgX1	Si CV < 5log copies/mL et HLA-B*5701 négatif
TDF/FTC 245/200mgX1	ATV/r 300/100mgX1	
2 INTIs	INI	Commentaires
TDF/FTC 245/200mgX1	DTG 50mgX1	
ABC/3TC 600/300mgX1	DTG 50mgX1	Si HLA-B*5701 négatif
TDF/FTC 245/200mgX1	EVG/c 150/150mgX1	Si clairance de la créatinine > 70mL/min
TDF/FTC 245/200mgX1	RAL 400mgX2	

3TC : lamivudine ; ABC : abacavir ; ATV : atazanavir ; DRV : darunavir ; DTG : dolutégravir ; EFV : efavirenz ; EVG : elvitégravir ; FTC : emtricitabine ; INI : inhibiteurs d'intégrase ; IP: inhibiteurs de protéase ; r : ritonavir comme booster ; RAL : raltégravir ; TDF : ténofovir

2.3 Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

Première classe mise sur le marché (1987), les INTIs demeurent au cœur des combinaisons d'ARV. Les molécules appartenant à cette famille agissent par inhibition de la transcriptase inverse. Tous les INTIs peuvent être considérés comme des pro-drogues car ils subissent une triphosphorylation intracellulaire pour être actifs sur la transcriptase inverse. Ils sont alors incorporés dans le premier brin d'ADN proviral, en compétition avec les nucléosides naturels et conduisent à l'arrêt de la synthèse d'ADN viral. En effet, ce sont des analogues des nucléosides naturels, mais privés d'un groupement hydroxyle en 3' (didésoxynucléosides ou ddNTP) et donc incapables d'assurer la liaison 5'-3' avec le nucléoside suivant. Ils sont ainsi appelés « terminateurs de chaîne ». Un dérivé nucléotidique a été développé à la fin des années 1990: le ténofovir difumarate (TDF, VIREAD®), commercialisé en 2002. Le TDF présente l'avantage d'être déjà monophosphorylé, ce qui permet d'éviter la première étape de phosphorylation intracellulaire. Le TDF alafénamide (TAF), prodrogue du TDF bientôt disponible, pourrait avoir un impact rénal et osseux moindre que le TDF, conséquence de concentrations plasmatiques bien inférieures, pour une activité antivirale égale.

L'utilisation des INTIs a beaucoup évolué ces dernières années. Les associations à prise unique journalière dites " Single Tablet Regimen" (STR) TDF + emtricitabine (FTC) + efavirenz (EFV), TDF + FTC + elvitégravir (EVG) + cobicistat (c) et TDF + FTC + rilpivirine (RPV) ont été mises sur le marché commercialisée sous les noms respectifs d'ATRIPLA® en 2007, de STRIBILD® en 2013 et d'EVIPLERA® en 2014. En 2015, la première association

triple avec le dolutégravir (DTG), un Inhibiteur d'intégrase (INI) est arrivée: il s'agit de TRIUMEQ® (abacavir/lamivudine (ABC/3TC) + DTG). La simplicité de la prise en une fois par jour permet une amélioration de l'adhérence au traitement.

Les deux associations doubles les plus prescrites sont ABC/3TC (KIVEXA®) et TDF/FTC (TRUVADA®), qui ont largement été comparées. L'association ABC/3TC peut être intéressante chez un patient à risque rénal. L'association fixe AZT/3TC (COMBIVIR®, 2 prises par jour), est utilisée dans certaines situations particulières : nouveau-né de mère séropositive, recherche d'une bonne diffusion dans le LCR, femme enceinte. Sa toxicité mitochondriale est plus importante que celle de l'association TDF/FTC³². La présentation combinant AZT/3TC/ABC (TRIZIVIR®) présente une toxicité de classe cumulée et une efficacité antivirale moindre (Tableau 2).

Tableau 2: Caractéristiques des principales INTIs.

DCI	Zidovudine	Lamivudine	Abacavir	Ténofovir	Emtricitabine
Spécialités	Retrovir®	Epivir®	Ziagen®	Viread®	Emtriva®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	300 mg x 2	150mg x 2 ou 300 mg x 1	300 mg x 2 ou 600mg x1	245 mg x 1	200 mg x 1
Principaux effets secondaires	Myélotoxicité (surveillance NFS) Myopathie Nausées Acidose lactique	Myélotoxicité en association avec AZT	Réactions d'hypersensibilité (fièvre, rash, nausées, vomissements) : recherche de l'allèle HLA B*5701. Risque proche de zéro chez les non porteurs.	Toxicité rénale (surveillance fonction rénale)	Céphalées Diarrhée Nausées Elévation CK

2.4 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs).

Le premier dérivé de cette famille à avoir été utilisé dans le traitement de l'infection par le VIH est la névirapine (NVP, VIRAMUNE®) en 1996. Il représente avec l'éfavirenz (EFV SUSTIVA®) les INNTIs de 1^{ère} génération. Ces INNTIs ont une barrière génétique particulièrement faible : les mutations de résistance apparaissent rapidement lorsque la charge virale devient détectable, même en-dessous de 200 copies/mL. Par conséquent, cette classe d'ARV est à éviter chez tout patient peu observant ou chez lequel l'indétectabilité de la charge virale est compromise par la présence d'une résistance déjà importante. De plus, cette classe doit toujours être administrée au sein d'une trithérapie au minimum. Une seconde génération d'INNTIs est représentée par l'étravirine (ETR, INTELENCE®) et la RPV (EDURANT®). L'ETR a une barrière génétique plus élevée et est active sur certaines souches de virus résistants à la NVP ou l'EFV, mais une résistance croisée existe avec la rilpivirine. De structure chimique différente des INTIs, les INNTIs sont des inhibiteurs puissants et très sélectifs de la TI du VIH ; ils sont inactifs sur le VIH-2 et ne sont pas utilisés non plus sur le VIH-1 groupe O. Cependant l'ETR présente une activité *in vitro* contre le groupe O. A la différence des analogues nucléosidiques, ils inhibent la TI de façon non compétitive, en se fixant directement au niveau d'une poche hydrophobe à proximité du site catalytique de l'enzyme. Pour être actifs, ils ne nécessitent pas de modification chimique. Ils sont métabolisés *quasi* exclusivement par le foie avec une demi-vie longue, permettant une prise unique journalière, et sont donc utilisables dans les associations à prise unique journalière.

Depuis 2014, la NVP n'est plus recommandée en 1ère intention en France, au vu des contraintes de prescription et de surveillance clinique et biologique. L'étravirine (ETR) a l'AMM dans le traitement de l'infection par le VIH-1 chez les patients adultes prétraités par des ARV. En effet, la molécule a principalement été évaluée en association avec un traitement optimisé, puisque l'intérêt de l'ETR est de montrer une barrière génétique un peu plus élevée et de rester en théorie active sur des virus résistants à la NVP ou à l'EFV.

L'essai ACTG A5142 a comparé l'EFV au lopinavir boosté par du ritonavir (LPV/r) : le taux de réponse virologique était meilleur dans le bras EFV, mais une meilleure réponse immunologique, moins de résistance en cas d'échec, et moins de lipodystrophie étaient observées dans le bras LPV/r³³. Lors de l'essai ACTG 5202, a été comparé en double aveugle EFV versus atazanavir/r (ATV/r) avec soit ABC/3TC soit TDF/FTC et cette étude n'a pas mis en évidence de différence d'efficacité virologique entre les deux, mais l'ATV/r était mieux toléré. Dans l'essai SINGLE, avec TDF/FTC, la supériorité du dolutégravir (DTG) par rapport à l'EFV a été montrée. L'EFV reste tout de même recommandé comme 3^e agent ARV en première ligne de traitement à l'heure actuelle.

Deux essais randomisés en double aveugle (ECHO and THRIVE) ont comparé la rilpivirine (RPV) *versus* EFV en association à deux INTIs chez des patients naïfs de traitement. A 96 semaines, la non-infériorité de la molécule a été démontrée si la CV était inférieure à 100 000 copies/mL et le nombre de CD4 supérieur à 200/mm³. Le profil de tolérance était meilleur³⁴. La RPV se trouve en combinaison fixe dans la trithérapie EVIPLERA® (FTC 200mg + TDF 245mg + RPV 25mg ; STR). Cette association a l'AMM européenne dans le traitement du patient adulte infecté par le VIH-1 naïf de traitement et ayant une charge virale < 100 000 copies/mL.

Tableau 3: Principales caractéristiques des INNTIs.

DCI	Névirapine	Efavirenz	Etravirine	Rilpivirine
Spécialité	Viramune®	Sustiva®	Intérence®	Edurant®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	200 mg x 1 pendant 14 jours puis 200 mg x 2	600 mg x 1	200 mg x 2	25mg x 1
Principaux effets secondaires	Eruptions cutanées Hépto-toxicité (surveillance rapprochée des transaminases)	Signes neuropsychiques en début de traitement Eruptions cutanées Syndrome dépressif Anomalie fermeture tube neural (CI : Femme enceinte)	Cas sévères de syndrome d'hypersensibilité (Lyell, DRESS)	Effets neuropsychiatriques Eruptions cutanées Troubles digestifs Dyslipidémie

2.5 Inhibiteurs de la protéase (IPs)

L'arrivée de cette classe d'ARV en 1996 a révolutionné la prise en charge des malades. Les IPs agissent en inhibant la protéase dont le rôle est de cliver les précurseurs des protéines virales pour les rendre fonctionnelles (polyprotéines Gag et Gag-Pol). Ce sont, pour la plupart, des peptidomimétiques qui vont se lier de façon compétitive sur le site actif de la protéase. Ainsi, les IPs bloquent une phase tardive de la maturation virale. Les nouveaux virus seront immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules. Ils sont actifs sur les VIH-1 et 2. Les IPs potentialisés ont une barrière génétique plus élevée que les INNTIs et n'entraînent que rarement des résistances précoces, même en cas d'observance imparfaite. Ils sont tous métabolisés au niveau hépatique par les cytochromes P450, particulièrement par le CYP3A, et de nombreuses interactions médicamenteuses sont à prendre en compte. Leurs principaux effets indésirables de classe sont les dyslipidémies, notamment lors de l'utilisation du LPV/r (KALETRA®). Les anciennes molécules étaient responsables de lipodystrophies.

L'utilisation d'un IP s'effectue potentialisée (« boostée ») par l'addition d'une faible dose de ritonavir (r), qui confère une efficacité renforcée (important effet inhibiteur du CYP3A par le ritonavir) mais rendant parfois souhaitable le contrôle des concentrations plasmatiques résiduelles, notamment pour surveiller un éventuel surdosage. L'atazanavir (ATV, REYATAZ®) peut échapper à cette règle et être parfois utilisé sans ritonavir.

Le nelfinavir (NFV) n'est plus utilisé en France. L'indinavir (IDV, CRIVAN®) est peu prescrit aujourd'hui. La prescription du tipranavir (TPV, APTIVUS®) est rare

également, de part de nombreuses interactions médicamenteuses. La principale toxicité du TPV est le risque d'hépatite médicamenteuse, avec une cytolysse parfois sévère. Le LPV/r n'est plus recommandé comme 3^{ème} agent d'une première trithérapie depuis 2014 en France^{27,30}.

L'ATV/r (essai CASTLE) et le darunavir/r (DRV/r, PREZISTA®, essai ARTEMIS) ont été comparés au LPV/r chez des patients naïfs de traitement et ont prouvé leurs non-infériorités virologique et immunologique^{35,36}. L'ATV se prend en une prise par jour et possède une bonne tolérance clinique. Le DRV possède une haute affinité pour la protéase et une barrière génétique particulièrement élevée, comme l'ont attesté les résultats de l'essai MONOI (DRV en monothérapie *versus* trithérapie dans le maintien du contrôle virologique chez des patients ayant déjà une charge virale indétectable)³⁷. Les essais POWER 1 et 2 ont démontré l'efficacité du DRV chez les patients en échec d'un régime thérapeutique comportant un autre IP, avec un taux de succès remarquable à 96 semaines³⁸.

Pour conclure, si on choisit un IP/r comme 3^e agent d'une trithérapie en première intention, il est actuellement recommandé d'utiliser préférentiellement l'ATV/r ou le DRV/r.

Enfin, nous pouvons ajouter qu'une nouvelle classe d'ARV vise elle-aussi l'étape de clivage des précurseurs : il s'agit des inhibiteurs de maturation, dont la cible n'est cette fois plus l'enzyme mais le substrat de l'enzyme, Gag. Le bévirimat, 1^{ère} molécule de cette classe, dont le développement a été stoppé, s'est heurté à de nombreuses résistances naturelles. De nouveaux composés, qui semblent moins impactés par le polymorphisme, sont en développement (GSK-2838232, BMS-955176).

Tableau 4: Caractéristiques des principales IPs.

DCI	Ritonavir	Tipranavir	Atazanavir	Lopinavir/ r	Darunavir
Spécialité	Norvir®	Aptivus®	Reyataz®	Kaletra®	Prezista®
Posologie moyenne avec Ritonavir (adulte / 24h)	N'est plus utilisé en tant qu'antirétroviral mais en tant que « booster »	500 mg/100mg x 2	300/100 mg x 1	200/50 mg x 2/j	600/100 mg x2/j ou 800/100 mg x1/j
Principaux effets secondaires	Troubles digestifs Paresthésies péri-orales Dysgueusies Lipodystrophie Augmentation des transaminases	Toxicité hépatique Hyperlipémie Saignement Eruptions cutanées Céphalées Troubles digestifs	Lipodystrophie Troubles du système nerveux Ictère oculaire Jaunisse Troubles digestifs Rash	Troubles digestifs Eruptions cutanées Augmentation des transaminases, de l'amylase et des GGT	Dyslipidémie, Hyperglycémie Lipodystrophie Troubles digestifs

2.6 Inhibiteurs d'entrée

Deux classes agissant sur l'étape d'entrée du virus dans la cellule sont commercialisées ; une troisième, les inhibiteurs d'attachement, est en cours d'étude.

- Inhibiteur de fusion

L'enfuvirtide (T20, FUZEON®), apparu sur le marché en 2003, est un polypeptide synthétique dont la séquence correspond à la région HR2 de la gp41 qui se fixe sur la région HR1 de cette glycoprotéine. En se liant à la gp41, elle bloque la fusion virus/cellule par inhibition compétitive. Elle n'est pas active sur le VIH de type 2. Sa barrière génétique est faible ce qui implique de ne pas l'utiliser seule. Elle peut être utilisée dans le traitement des patients en situation d'échec. Le T20 ne peut être administré que par voie sous-cutanée en deux fois par jour avec des réactions assez fréquentes au point d'injection. Les contraintes de ces injections ont limité assez rapidement son utilisation, surtout depuis l'apparition des IPs de nouvelle génération et des anti-intégrases, faisant de cet ARV une molécule de dernier recours.

- Inhibiteur de CCR5

De la classe des inhibiteurs du corécepteur CCR5, seul le maraviroc (MVC, CELSENTRI®) a été mis sur le marché et dispose d'une AMM. Son utilisation nécessite que le tropisme de virus soit vérifié au préalable ; il est inactif si le virus peut utiliser le corécepteur CXCR4³⁹. Le MVC se fixe sur la partie transmembranaire du corécepteur CCR5, empêchant ainsi l'entrée du virus dans la cellule. Il bénéficie d'une bonne

tolérance. En revanche, étant métabolisé par le cytochrome P450, notamment le CYP3A4, les interactions médicamenteuses sont nombreuses. Sa posologie est de 150 à 600mg x 2/jour.

- Inhibiteur d'attachement

Un nouvel inhibiteur d'attachement a récemment été mis au point par la firme Bristol Myers Squibb: le BMS-626529, prodrogue d'un premier inhibiteur d'attachement, le BMS-663068. Il inhibe sélectivement l'attachement du virus au récepteur CD4, en se liant à la gp120 et empêche ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le sous-type CRF01_AE et le VIH-1 du groupe O ne semblent pas sensibles à cette molécule, dont l'activité apparaît indépendante du tropisme viral ⁴⁰.

2.7 Inhibiteurs d'intégrase (INIs)

Le raltégravir (RAL, ISENTRESS®), premier représentant de la classe des INIs, a été commercialisé en 2007. L'elvitégravir (EVG), puis le DTG ont ensuite été développés. Ces molécules sont des inhibiteurs sélectifs de transfert de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte, et donc de l'intégration du génome viral à celui de l'hôte (étape dirigée par l'intégrase). Elles sont capables de réduire rapidement la charge virale plasmatique mais possèdent une barrière génétique variable selon les molécules. Elles sont bien tolérées. Le RAL a été comparé à la dose de 400mg deux fois par jour (demi-vie de 9h) à l'EFV en association avec TDF/FTC chez 566 patients naïfs de traitement (essai STARTMRK). Sa

non-infériorité a été démontrée en termes d'efficacité virologique ⁴¹. La tolérance était meilleure et la rapidité de décroissance de la charge virale plus importante. Dans l'essai ACTG A5257, le RAL a été comparé avec des IPs (ATV/r ou DRV/r) en association avec TDF/FTC chez 1809 patients naïfs. Le RAL était supérieur aux 2 IPs en termes de délai de survenue d'un échec virologique ou d'un arrêt de traitement pour intolérance, avec un risque de résistance en cas d'échec plus élevé.

L'EVG, métabolisé par le CYP3A4 (demi-vie de 3 heures), nécessite d'être combiné avec un inhibiteur du CYP3A4, le cobicistat en l'occurrence. L'EVG a été développé dans une association TDF/FTC/EVG/c (STRIBILD®) en une prise unique journalière, dans le traitement du patient naïf de traitement. Cette combinaison a été évaluée dans deux essais de phase III de 700 patients et plus de 1000 patients naïfs de traitement versus TDF/FTC/EFV ou TDF/FTC/ATV respectivement: la non-infériorité de l'EVG a été montrée dans ces 2 essais ⁴². Cependant, le profil de résistance de l'EVG apparaît comparable à celui du RAL : il ne sera donc pas une option thérapeutique en cas de résistance à ce dernier.

Le DTG présente une barrière génétique plus élevée que le RAL ou l'EVG. Il est administré en une fois par jour et n'a pas besoin d'être potentialisé. Trois études de phase III ont comparé le DTG au DRV (essai FLAMINGO, associé à TDF/FTC ou ABC/3TC), à l'EFV (essai SINGLE, associé à TDF/FTC) et au RAL (essai SPRING-2, associé à TDF/FTC ou ABC/3TC). La supériorité, dans FLAMINGO et SINGLE, et la non-infériorité, dans SPRING-2, de l'association contenant du DTG ont été montrées, sans sélection de mutations de résistance.

Ces trois inhibiteurs sélectifs du transfert de l'ADN viral peuvent désormais faire partie de la 1^{ère} ligne thérapeutique.

Tableau 5: Caractéristiques des INIs.

DCI	Raltégravir	Elvitégravir	Dolutégravir
Spécialité	Isentress®	Dans l'association Stribild®	Tivicay®
Posologie moyenne (adulte / 24h)	400mg X2	EVG/cobicistat 150/150mg X1	50mg X1
Principaux effets secondaires	Troubles digestifs Rêves anormaux Insomnie Vertige, céphalées Augmentation des transaminases et des CPK Rash Asthénie, fatigue, fièvre	Troubles digestifs Rêves anormaux Vertige, céphalées Rash Asthénie, fatigue, fièvre	Troubles digestifs Rêves anormaux Vertige, céphalées Rash Asthénie, fatigue, fièvre

2.8 Traitement oral « préventif »

La prophylaxie pré-exposition (PreP) comme moyen de prévention du VIH fait beaucoup parler d'elle. Dans l'essai iPrEx, une prise quotidienne en continu d'un comprimé de TRUVADA® (TDF/FTC) apportait une réduction de l'incidence de 44% de l'infection par le VIH chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) et à haut risque de contamination⁴³. L'essai Partners PrEP a été mené auprès de couples hétérosexuels dont un des partenaires était infecté par le VIH. Les résultats ont prouvé que le TRUVADA® réduisait le risque de transmission de l'infection de 75% comparé au placebo⁴⁴. Néanmoins, le coût est très important, et les effets indésirables du traitement sont à considérer. L'étude Ipergay («Intervention Préventive de l'Exposition aux Risques avec et pour les Gays»), réalisée en double aveugle, a évalué une stratégie de prévention de l'infection par le VIH par traitement antirétroviral « à la demande » (TDF/FTC, avant et après rapports sexuels). Évaluée face à un placebo, la PrEP prise à la demande a démontré une efficacité de 86% dans le cadre de l'essai, signifiant qu'un participant prenant la PrEP avait 7 fois moins de risque d'être infecté par le VIH qu'un participant ayant pris le placebo. Cette efficacité était directement liée à l'observance. 35% des participants avaient contracté une IST.

Depuis 2012, la FDA (l'agence américaine du médicament) a déjà permis la mise sur le marché aux Etats-Unis du TRUVADA® dans l'indication de limiter le risque de contamination par le VIH des personnes séronégatives très exposées.

2.9 Traitements : autres

Le foscarnet, ou acide phosphonoformique (PFA), est un analogue pyrophosphate qui se fixe sur le site de fixation de celui-ci et inhibe ainsi l'activité de nombreuses ADN polymérase, mais également de la TI. Il diminue la charge virale du VIH⁴⁵ et agit de façon synergique avec les analogues de la thymidine. De plus, le foscarnet est capable de bloquer l'excision des terminateurs de chaîne catalysée par la TI, qui est un des principaux mécanismes de résistance aux analogues de la thymidine⁴⁶ (cf. 3. 2 Résistance aux INTIs : Thymidine Analogue Mutations (TAMs)). Les TAMs confèrent une résistance à ces ARV mais également une hyper-susceptibilité au foscarnet et il existe des interactions antagonistes entre les mutations provoquant la résistance à ces analogues et celles induisant des résistances au foscarnet, c'est-à-dire que la résistance au foscarnet (re)sensibilise le virus aux analogues de la thymidine et *vice versa*⁴⁷. Son administration par voie veineuse et sa néphrotoxicité en font un médicament de dernier recours, néanmoins utile chez des patients en situation de multi-résistance⁴⁸.

III. Résistance aux antirétroviraux

3.1 Les mutations de résistance

Même si le succès virologique est obtenu chez plus de 80% des patients, la prise en charge des patients en situation d'échec thérapeutique reste compliquée. Comme nous l'avons dit, les nombreuses erreurs de la TI lors de la rétrotranscription et les phénomènes de recombinaison apportent une grande variabilité au VIH. Une mutation émerge à chaque nouveau virion et cette mutation, si elle touche les gènes des protéines cibles des ARV, peut induire une résistance. Sous « pression de sélection », la souche résistante va être sélectionnée, d'où la nécessité de puissantes thérapies combinées au cours du traitement (Figure 3). L'observance du patient est primordiale.

Une seule et même mutation peut induire une résistance à plusieurs molécules de la même classe (résistance croisée) : c'est pourquoi il faut associer des molécules de classes thérapeutiques différentes.

Il existe également des inégalités de barrière génétique entre les molécules, ce qui inclut plusieurs notions : le nombre de changements nucléotidiques nécessaires pour obtenir une mutation de résistance, le type de changement nucléotidique nécessaire (une transition étant 2.5 fois plus fréquente qu'une transversion), l'impact de cette mutation sur la sensibilité à l'ARV et l'impact de cette mutation sur la capacité répliquative du virus. L'ensemble conditionnant la vitesse de sélection des variants résistants.

Enfin, il faut revenir sur cette notion de compartiments "sanctuaires", peu ou pas suffisamment accessibles aux ARV, dans lesquels les concentrations suboptimales d'ARV permettent une sélection des souches résistantes et peuvent aboutir à des souches présentant un avantage répliatif sous thérapie.

3.2 Résistance aux INTIs

La TI est un hétérodimère (2 sous-unités p66 et p51, de 560 et 440 acides aminés respectivement) qui a la forme d'une main ouverte. L'ARN viral se loge entre les doigts, la paume et le pouce et le site actif de l'enzyme, constitué de quatre acides aminés (YMDD : tyrosine, méthionine, 2 acides aspartiques), se situe au niveau de la paume. Les mutations de résistance peuvent apparaître au niveau du site actif de l'enzyme (M184V par exemple), au niveau du site de fixation des nucléosides (K65R, Q151M par exemple) ou à distance (T215Y/F).

Pour les INTIs, deux mécanismes de résistance sont impliqués. Le premier mécanisme consiste en l'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé par phosphoryse. L'enzyme détache l'analogue par son phosphate en rattachant celui-ci sur un accepteur externe (ATP, ou, de façon minoritaire, pyrophosphate), formant un complexe qui ne pourra plus être incorporé. Les mutations concernées sont nommées TAMs ("Thymidine Analogue Mutations") et sont donc sélectionnées par les analogues de la thymidine (AZT, stavudine (d4T)): il s'agit des mutations M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E⁴⁹. Les mutations en position 67 et 70, situées au niveau des doigts sur la TI, améliorent la flexibilité de l'enzyme, tandis que la mutation en position 215,

située dans la paume, favorise la fixation de l'ATP ⁵⁰⁻⁵². Les TAMs sont responsables, à divers degrés, d'une résistance croisée à l'ensemble de la classe thérapeutique, à l'exception du 3TC et du FTC qui sont épargnés.

Le deuxième mécanisme de résistance consiste en la diminution de l'incorporation des molécules ARV au profit des nucléosides naturels (résistance par discrimination ou par perte d'affinité) ⁵³. Ce mécanisme est décrit pour les mutations K65R, L74V, Q151M et son complexe dit MDR ("Multi Drug Résistance" : mutations A62V, V75I, F77L, F116Y). La mutation Q151M est sélectionnée par des traitements comportant du ddl, de l'AZT ou du d4T et entraîne une résistance à tous les INTIs sauf au TDF. La mutation M184V, très facilement sélectionnée par le 3TC, et, à moindre degré, par le FTC, confère également un haut niveau de résistance à ces molécules par ce mécanisme, résultat d'un encombrement stérique créé par la chaîne latérale de la valine. La mutation M184V a un impact négatif important sur la capacité répliquative du virus et le 3TC était même parfois maintenu pour cette seule raison après apparition de la mutation ⁵⁴. De plus, elle retarderait l'apparition des TAMs. Le ddl et l'ABC sélectionnent la mutation L74V mais aussi la mutation K65R. Associée à d'autres mutations, la mutation L74V peut contribuer à la résistance envers l'ABC, le ddl et le TDF (cf. tableau 5). L'ABC peut également sélectionner la mutation M184V. Le TDF induit la mutation K65R et, plus rarement, la mutation K70E ⁵. La présence de la mutation K65R sur le gène de la TI semble incompatible avec les TAMs ⁵⁵ et la L74V ⁵⁶ et impacte la capacité répliquative du virus. En fait, la plupart de ces mutations diminue la capacité répliquative des virus car l'incorporation des nucléosides naturels est également touchée.

Enfin, seule mutation non liée à une substitution, l'insertion en position T69, observée après traitement par analogue de la thymidine, confère une résistance importante à tous les INTIs.

Tableau 6: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon l'ANRS : INTIs. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	<ul style="list-style-type: none"> • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69 	
3TC/FTC	<ul style="list-style-type: none"> • K65R [11, 12, 16] • M184V/I • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • Q151M
ddl	<ul style="list-style-type: none"> • At least a score of + 2 among: M41L + T69D + 215Y/F + K219Q/E – K70R – M184V/I [5, 14, 15, 17, 18] • K65R [11, 12] • L74V/I [19] • Q151M • Insertion at codon 69 	
d4T	<ul style="list-style-type: none"> • V75A/M/S/T • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [6] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [4, 7, 14, 15] • K65R [30, 31, 32] • Q151M • Insertion at codon 69 	
ABC	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • K65R [9, 11, 12] • L74V/I [24, 25, 26, 27, 28, 29] • Y115F • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • M184V/I [36]
TDF	<ul style="list-style-type: none"> • At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 20, 33] • K65R/E/N [9, 10, 11, 12, 34, 35] • Insertion at codon 69 • K70E [21, 22, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 33]

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ddl: didanosine, d4T: stavudine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir

3.3 Résistance aux INNTIs

La résistance aux INNTIs implique des mutations ponctuelles au niveau de la poche hydrophobe proche du site actif de la TI (bords du site de fixation des INNTIs), qui diminuent la flexibilité de l'enzyme. Il s'agit de molécules à faible barrière génétique, avec une résistance croisée très forte entre la NVP et l'EFV (sur les codons 100 à 108 et 179 à

190), molécules de première génération. La concentration inhibitrice 50% (CI50) peut être augmentée de plus de 100 fois.

Les effets de ces mutations sur la capacité répliquative du virus seraient faibles, et ainsi les mutations perdurent très longtemps^{57,58}.

L'ETR a une barrière génétique plus élevée que les autres molécules de cette famille. La RPV ne présente pas un meilleur profil de résistance que l'ETR, contrairement à ce qui était espéré, et malgré son développement ultérieur. La mutation E138K est sélectionnée sous RPV, souvent accompagnée de la mutation M184I³⁴. Des expériences de mesures de l'activité de la TI *in vitro* ont montré que le mutant E138K/M184I possédait une meilleure activité de TI que le mutant E138K/M184V, apportant un avantage répliquatif (capacité répliquative similaire au virus sauvage en l'absence d'ARV). D'autres travaux suggèrent qu'il apporterait une résistance plus élevée à la RPV⁵⁹.

La résistance croisée avec les molécules de première génération est moindre, mais il existe une résistance croisée entre ces deux molécules de deuxième génération. Il est en tout cas important de maintenir la charge virale indétectable sous ces molécules.

Tableau 7: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon l'ANRS : INNTIs. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
EFV	<ul style="list-style-type: none"> • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106M [2] • E138K [12, 13] • Y181C/I • Y188C/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • P225H • M230L 	
NVP	<ul style="list-style-type: none"> • A98S (for HIV-1 subtype C only) [3] • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106A/M [2] • Y181C/I • Y188C/H/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • M230L 	<ul style="list-style-type: none"> • E138K [13]
ETR	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138K [12, 13] • Y181C/I/V [5, 6] • H221Y [7] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138A/G/Q/R/S [5, 6, 7, 8]
RPV	<ul style="list-style-type: none"> • K101E/P [9, 13] • E138A/G/K/Q/R/S [12, 13, 14] • V179L [9] • Y181C/I/V [13] • Y188L [9] • H221Y [13] • M230I/L/V [9] • L100I + K103N/S [9, 15] • L100I + K103R + V179D [15] 	<ul style="list-style-type: none"> • V179D [16]

EFV: efavirenz, NVP: nevirapine, ETR: etravirine, RPV : rilpivirine

3.4 Résistance aux IPs

La protéase du VIH-1, responsable de la maturation du virion par clivage des polyprotéines précurseurs Gag et Gag-Pol, est un homodimère composé de deux sous-unités de 99 acides aminés chacune.

Les mutations induisent des changements conformationnels qui vont diminuer l'affinité de l'enzyme pour l'IP mais aussi possiblement pour le substrat, d'où une capacité répliquative réduite.

L'acquisition de mutations de résistance, au niveau du site actif de l'enzyme ou à distance, se fait par étape, avec accumulation progressive de mutations (barrière génétique élevée).

Les premières sélectionnées, dites primaires ou majeures comme les mutations D30N, G48V, I50L/V, V82A/F/L/S/T, I84V/A et L90M, se trouvent souvent au niveau du site actif de l'enzyme.

Elles peuvent être spécifiquement dues à un IP, comme c'est le cas de la mutation I50L sélectionnée par l'ATV chez des patients naïfs de traitement ou de la mutation I50V sélectionnée par le fosamprénavir (fosAPV). D'autres mutations responsables de résistance croisée peuvent être sélectionnées, notamment les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M. Par exemple, le TPV sélectionne des mutations communes à beaucoup d'autres IP, comme les mutations V82L/T et I84V.

Les mutations dites secondaires, s'accumulent ensuite et renforcent la résistance aux IPs et/ou améliorent la capacité répliquative du virus. Elles peuvent faire partie du polymorphisme viral, et sont souvent communes aux différents IPs.

En terme de fréquence de sélection de mutation de résistance, une grande différence existe entre les patients en 1^{ère} ligne thérapeutique traités par IPs potentialisés par le ritonavir et ceux traités par IPs non potentialisés. Les échappements sous IPs potentialisés s'accompagnent de la sélection de très peu de mutation au niveau du gène de la protéase, d'où les recommandations actuelles⁶⁰. En effet, le ritonavir diminue l'élimination de l'IP associé en inhibant les cytochromes P450 : il permet ainsi de maintenir des concentrations plus élevées et d'allonger la demi-vie du médicament,

évitant des taux résiduels sub-optimaux qui favorisent l'émergence de virus résistants. De plus, il existe un bénéfice en termes de tolérance et d'interactions médicamenteuses puisque les posologies des IPs utilisés avec le ritonavir sont bien inférieures.

Par ailleurs, depuis quelques temps déjà, la présence de mutations dans le gène gag fait l'objet d'une attention particulière. Des études ont montré que des mutations au niveau des sites de clivage, mais pas seulement, pourraient également induire une résistance aux IPs ⁶¹. La présence de mutations situées au niveau des sites de clivage était associée à l'échec dans l'étude MONARK, par exemple. Le sous-type du VIH-1 serait également important ⁶². Des études complémentaires doivent néanmoins être menées sur le sujet pour définir exactement les mutations corrélées à l'échec thérapeutique.

Tableau 8: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon

l'ANRS : IPs. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site

<http://www.hivfrenchresistance.org>

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
IDV	<ul style="list-style-type: none"> M46I/L V82A/F/M/S/T [11] I84A/V [8] L90M and at least 2 among: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I 	<ul style="list-style-type: none"> L90M
SQV/RTV 1000/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> G48V At least 3 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20V/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9] 	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20V/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9]
NFV	<ul style="list-style-type: none"> D30N I84A/V [8] N88S/D L90M 	<ul style="list-style-type: none"> V82A/F/S/T and at least 2 among: L10I, M36I, M46V/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I [1]
LPV/r	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21] I47A [15, 16] L76V [18, 19] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21]
FPV/RTV 700/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> I50V V32I and I47A/V [2, 13, 14] At least 4 mutations among: L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M [2, 20] 	
ATV/RTV 300/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> I50L [6] N88S [28,29,30] At least 3 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31] 	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31]
TPV/RTV 500/200 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least a score of + 3*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> A score of + 2*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23]
DRV/RTV** 600/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26]
800/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26] 	

IDV: indinavir, SQV: saquinavir, NFV: nelfinavir, RTV: ritonavir, FPV: fosamprenavir, LPV: lopinavir, ATV:atazanavir, TPV: tipranavir, DRV : darunavir

* Insufficient data for HIV-1 subtype non-B

** Please note that rules are different for DRV/RTV 600/100 mg BID and 800/100 mg QD

3.5 Résistance aux inhibiteurs de fusion

L'enfuvirtide (T20), seul représentant de sa classe, possède une faible barrière génétique. En effet, en cas de répllication virale sous T20, des mutations au niveau des acides aminés 36 à 45 du domaine HR1 de la gp41 apparaissent rapidement ⁴⁹. Cette

molécule doit être associée à d'autres molécules pleinement actives pour éviter un échec virologique rapide. Il n'y a pas de résistance croisée entre le T20 et les autres inhibiteurs d'entrée que sont les inhibiteurs de CCR5.

Tableau 9: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon l'ANRS : inhibiteurs de fusion. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>

	Mutations associated with resistance
ENF T20	<ul style="list-style-type: none"> • G36A/D/E/S/V [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7] • V38A/E/K/M • Q40H/K/P/T • N42D/T • N43D/H/K/S • L44M • L45Q/M

ENF (T20): enfuvirtide

3.6 Résistance aux inhibiteurs de CCR5

L'émergence d'une sous-population CXCR4 minoritaire à l'instauration du traitement constitue le mécanisme principal de résistance aux inhibiteurs de CCR5⁶³. La détermination du tropisme viral est évidemment une nécessité avant toute prescription de cet ARV et en cas d'échec thérapeutique. Certains virus R5 pourraient également soit changer de tropisme et utiliser les corécepteurs CXCR4, soit devenir résistants à cette molécule par acquisition de mutations au niveau de la boucle V3 de la gp120, notamment aux positions 13 et 26⁶³.

3.7 Résistance aux inhibiteurs d'intégrase

La barrière génétique des molécules de première génération de cette famille d'ARV est plutôt faible et la charge virale doit être indétectable sous cette classe de molécules.

Deux profils sont majoritaires lors de la résistance au RAL : soit la mutation N155H, soit la mutation Q148H/K/R, associées à d'autres mutations secondaires. Le profil N155H est moins fréquent, sans doute à cause de son impact sur la capacité répliquative du virus. Plus rarement encore, les mutations Y143C/H/R peuvent être retrouvées en cas de résistance à cette molécule. L'EVG peut sélectionner différents profils (mutations T66I/A/K, E92Q, N155H ou Q148H/K/R)⁶⁴. La résistance croisée entre ces deux molécules est très importante. Le DTG a montré une bonne efficacité chez la plupart des patients en échec sous RAL, même si certaines mutations acquises sous RAL (surtout les mutations Q148H/K/R associées à d'autres mutations) peuvent diminuer voire annuler son efficacité. Cette molécule est classée en inhibiteur d'intégrase de seconde génération.

Tableau 10: Algorithme d'interprétation 2015 des profils de résistance selon l'ANRS : inhibiteurs d'intégrase. La bibliographie des références entre crochet est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
RAL	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [10] • E92Q [1, 2] • G118R [10, 17] • F121Y [10,17] • G140A/S [7] • Y143A/C/G/H/R/S [1, 3, 4, 5, 8, 14] • Q148E/G/H/K/R [1, 2] • V151L [9] • N155H/S/T [1, 2, 9] • E157Q [2] • A49G + S230G/R + R263K [18] 	
EVG	<ul style="list-style-type: none"> • T66I/A/K [6] • E92Q [6] • G118R [17] • F121Y [9,17] • E138K • G140C/S • Y143A/C/G/H/R/S [14] • P145S [9] • S147G • Q148H/R/K [6] • V151L [9] • N155H/S/T [6,9] • E157Q [11] • R263K [18] 	
DTG* 50 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12,13] • F121Y [17] • V151L [9] • S153Y [9] • R263K [16] • T66K + L74M [9] • E92Q + N155H • Q148H/K/R + at least 2 mutations among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15] • Q148R + N155H 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • S153F [9] • E157Q [19, 20] • Q148H/K/R + 1 mutation among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15]
50 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12,13] • F121Y [17] • E138A/K/T [15] • G140A/C/S [15] • Q148H/K/R [15] • V151L [9] • S153Y [9] • N155H [18] • R263K [16] • T66K + L74M [9] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • S153F [9] • E157Q [19, 20]

RAL: raltegravir, EVG: elvitegravir, DTG: dolutegravir

3.8 La résistance d’hier à aujourd’hui

La première résistance aux ARV a été décrite chez des patients traités en monothérapie par la zidovudine en 1989⁶⁵. Puis, malgré la diversification des molécules, la résistance a été une cause majeure d’échec avec de véritables situations d’impasses

thérapeutiques. Plusieurs approches ont été tentées chez ces patients, telles que l'arrêt de certaines molécules pour tenter de « réverter » les mutations de résistance^{66, 67}. Puis l'évolution de l'arsenal thérapeutique, avec l'arrivée de l'ETR du côté des INNTIs et du DRV du côté des IPs depuis le milieu des années 2000 jusqu'à la mise sur le marché des inhibiteurs d'intégrase, a bouleversé la prise en charge des patients en échec.

En 2009, l'étude Multivir a évalué la prévalence de la résistance aux ARV en France, chez les 15% de patients traités en situation d'échec virologique (> 50 copies/mL), quelle que soit la ligne de traitement⁶⁸. Les souches virales présentaient une résistance à au moins un ARV dans 59% des cas et le pourcentage de patients avec un virus résistant à toutes les molécules d'une classe était de 8.8%, 8.6% et 4.5% pour, respectivement, les INTIs, les INNTIs et les IPs, avec une résistance complète à au moins deux classes chez 3.5% des isolats. Plus de 80% des virus résistants à l'EFV ou NVP étaient également résistants à la RPV. La résistance au RAL concernait 66% des patients traités par cette molécule et en situation d'échec. Au total, 9.3% des patients traités pouvaient contribuer à la transmission de virus résistants. Par rapport aux données de 2004, on observait une diminution significative de la prévalence de la résistance pour toutes les molécules (à l'exception du DRV, dont l'utilisation s'est répandue entre 2004 et 2009)⁶⁹. En effet, en 2004, 19% des patients traités pouvaient contribuer à la transmission de virus résistants.

En 2010/2011, les échantillons de 661 patients infectés par le VIH-1 et nouvellement diagnostiqués en France ont été analysés afin d'estimer la résistance transmise (TDR : "Transmitted Drug Resistance"). La prévalence des virus portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux, chez les patients naïfs chroniquement infectés, sur le gène de la protéase ou de la transcriptase inverse était de

9 % (IC95% : 6.8%-11.2%) par la technique de séquençage classique de Sanger, chiffre stable par rapport à 2006/2007. Par famille d'ARV, la prévalence des virus portant au moins une mutation de résistance était de 1.8%, 6.2% et 2.4% pour les IPs, les INTIs et INNTIs, respectivement. La résistance à une, deux ou trois classes d'ARV était observée dans 7.9%, 0.9% et 0.2% des patients, respectivement. Cette prévalence n'était pas différente en fonction de la durée de séropositivité et des caractéristiques sociodémographiques des patients. En revanche, il existait une relation entre les groupes à risque et la prévalence de la résistance transmise: les homosexuels masculins infectés par un virus de sous-type B constituaient le groupe le plus fréquemment infecté par un virus résistant ⁷⁰.

3.9 Variants minoritaires et résistance aux antirétroviraux

Les variants minoritaires résistants (VRMs), sont, par définition, des variants non détectés par les techniques classiques de séquençage : ils représentent donc moins de 15-20% de la population virale totale circulante et sont détectés par de nouvelles techniques de séquençage (UDS : "Ultra-Deep Sequencing"). Même à de très faibles pourcentages, ils peuvent être une source d'échec virologique ⁷¹. Effectivement, il faut concevoir la sélection naturelle résultante des différentes pressions subies par le virus comme un phénomène dynamique. Le temps pour obtenir un état de résistance dépend de la réplication résiduelle sous traitement et des différentes notions englobées par le terme de barrière génétique abordé précédemment (cf. 3.1 Les mutations de résistance).

Plusieurs études montrent que la prise en compte des VRMs permettrait de réduire le taux d'échec thérapeutique. Une revue de la littérature rapporte notamment que, chez des patients naïfs de traitement, la présence de VRMs aux INNTIs, ARV possédant une faible barrière génétique (détectés en PCR allèle spécifique essentiellement), serait prédictive d'un risque d'échec thérapeutique en première ligne de traitement multiplié par 2,5 à 3 fois ². Une étude cas-témoins européenne, effectuée par séquençage haut débit cette fois, est venue confirmer ces données dernièrement ³.

L'impact des variants minoritaires sur la résistance aux INTIs reste plus controversé : quelques études ont présenté une relation possible entre VRMs préexistants et échecs thérapeutiques ^{72,73}. Dans l'étude CASTLE par exemple (TDF + FTC + LPV/r ou ATV/r en première ligne de traitement), il n'y avait globalement pas plus de mutations de résistance transmise détectées par UDS avant traitement parmi les échantillons des patients en situation d'échec virologique par la suite par rapport aux patients répondeurs (échecs : n=52 ; groupe contrôle : n=95). En revanche, en étudiant les données par classe thérapeutique, il existait un nombre élevé d'échecs virologiques lorsque des mutations aux INTIs étaient détectées avant traitement : 6 échecs chez 9 patients dont le virus présentait une mutation M184I/V (dont 7 en VRMs ; 4 également porteurs de TAMs (3 en VRMs) ; 1 porteur d'une mutation K65R et de TAMs en VRMs) et 7 échecs chez 16 patients dont le virus présentait de multiples TAMs en UDS ⁷². D'autres études ne mettent pas en évidence de lien entre les deux : c'est le cas de l'équipe de Metzner *et al.* qui n'a pas détecté de sélection de la mutation M184V après instauration d'un traitement par un 2 INTIs et 1 IP boosté pour 7 patients chez lesquels cette mutation était présente avant traitement, de façon minoritaire (PCR spécifique d'allèle) ⁷⁴. Néanmoins, très peu

d'études ont été réalisées à l'heure actuelle et les données sont insuffisantes pour conclure.

Concernant le gène de la protéase, Fisher *et al.* ont retrouvé des VRMs chez 5 des 7 patients en échec de deuxième ligne thérapeutique (contenant du LPV/r), dont 4 concernant des mutations dites majeures⁷⁵. L'analyse par UDS des échecs de 1^{ère} ligne de l'étude CASTLE ne présentant pas de mutation en séquençage classique ne retrouvait des VRMs constituant des mutations majeures que dans une minorité de cas (3/36), sans impact sur les tests phénotypiques de résistance⁷⁶. Dans ces deux études, les VRMs étaient détectés à de très faibles taux (<1.5%).

Là encore, peu d'études se sont intéressées aux VRMs concernant la résistance aux anti-intégrases et les résultats sont contradictoires⁷⁷⁻⁸¹. Il serait envisageable que cette classe thérapeutique soit impactée de la même manière que les INNTIs : effectivement, il s'agit d'ARV à faible barrière génétique, pour lesquels un seul changement d'acide aminé suffit à induire une diminution d'activité. Néanmoins, les résultats des études, effectuées chez des patients pré-traités et en thérapie de "sauvetage", ne sont pas aussi tranchés. L'équipe de Liu *et al.* a mis en évidence une prévalence plus importante de VRMs avant l'échec virologique (46% *versus* 31%, différence non significative ; 36 et 35 patients en situation de succès et d'échec virologique, respectivement) et a montré une émergence de 6 de ces VRMs à l'échec (1 mutation N155H et 5 mutations secondaires). Un cas d'émergence des mutations Q148R et N155H lors d'un échec virologique a également été rapporté par Codoñer *et al.* En revanche, Armenia *et al.* n'ont pas retrouvé d'association statistique entre les mutations présentes avant traitement et l'échec virologique (n=23 ; seules des mutations secondaires avaient été détectées avant traitement).

Enfin, la recherche de variants minoritaires semble avoir une place toute indiquée dans l'étude du tropisme du viral, requise avant utilisation du MVC (inhibiteur du corécepteur CCR5). En effet, il est maintenant bien établi qu'une population minoritaire utilisant le corécepteur CXCR4 avant traitement peut jouer un rôle dans l'échec virologique au MVC⁸²⁻⁸⁴. L'équipe de Swenson *et al.* a notamment mis en évidence une relation inversement proportionnelle entre le pourcentage de virus à tropisme non-R5 à avant traitement et le succès virologique après addition de MVC chez des patients déjà traités et virémiques (n=1827)⁸³.

La plupart de ces études ont été réalisées chez des patients en 1^{ère} ligne de traitement (corrélation entre la présence de VRMs avant tout traitement et réponse virologique sous traitement). Quelques études se sont penchées sur les échecs de seconde ligne thérapeutique ou plus. Le *et al.* ont montré, chez des patients en situation d'échec thérapeutique et largement pré-traités, que les VRMs (détectés chez tous les malades) étaient corrélés dans près de 80% des cas à l'historique thérapeutique, soulignant l'importance du séquençage haut débit lorsque les génotypes antérieurs ne sont pas disponibles⁸⁵. En revanche, l'étude de l'impact des VRMs sur la réponse virologique dans l'essai ANRS 139 TRIO n'a pas mis en évidence de lien entre la présence à taux élevé de VRMs à avant traitement et l'échec virologique, excepté pour l'ETR⁸⁶. Les patients inclus dans cet essai avaient reçu de nombreux ARVs dans le passé mais étaient naïfs pour les trois molécules testées (RAL, DRV et ETR).

Par ailleurs, peu d'études ont examiné la prévalence de la résistance transmise au sein de groupes de transmissions ou chez les patients infectés par le VIH-1 et récemment diagnostiqués. Cunningham *et al.* ont présenté une étude par UDS des populations virales

de 96 HSH nouvellement diagnostiqués pour le VIH-1 et naïfs de traitement ARV (gène *pol* ; International HIV Drug Resistance Workshop 2014, Berlin). Selon la liste consensus des mutations de résistance étudiées dans la surveillance de la TDR ⁸⁸, la prévalence de mutations de résistance était de 11.5% en Sanger *versus* 20.8% en UDS. Des VRMs étaient ainsi détectés dans 9 échantillons, impactant essentiellement les IPs (n=9) ⁸⁷. Garcia-Diaz *et al.* ont par ailleurs analysé les échantillons de 107 patients infectés par le VIH-1, récemment diagnostiqués et naïfs d'ARV (107 séquençages des gènes de la RT et de la Protéase, 57 séquençages du gène de l'intégrase ; HIV Drug Therapy Congress 2014, Glasgow). Selon les algorithmes de l'Université de Stanford ⁸⁹ et la liste des mutations associées à la résistance aux ARV publiée par l'IAS ⁹⁰, la prévalence de mutations de résistance était de 3.7% en Sanger *versus* 15.0% en UDS. Des VRMs étaient ainsi détectés dans 12 échantillons, impactant essentiellement les INTIs (n=9) et les INNTIs (n=7) ⁹¹. Aucune mutation touchant les INIs n'a été retrouvée, ni en Sanger, ni en UDS. Les données de ces deux abstracts n'ont pas encore été publiées.

Pour finir, Bellecave *et al.* ont publié une étude sur 47 patients infectés par le VIH-1 et naïfs d'ARV (séquençages du gène de la RT). Selon la liste consensus des mutations de résistance étudiées dans la surveillance de la TDR ⁸⁸, la prévalence de mutations de résistance était de 8.5% en Sanger *versus* 17.0% en UDS. Des VRMs étaient ainsi détectés dans 4 échantillons (M184V (3.6%) et K103N (2.9%) : évolution vers l'échec virologique après mise sous TDF, FTC et NVP, avec émergence de ces 2 mutations à plus de 90% ; M184V (16.8%) ; K103N (11.8%) ; M230L (2.04%)). Dans 3 des quatre cas, la charge virale mutationnelle était supérieure à 20 000 copies/mL, alors qu'il a été montré un risque d'échec dépendant de la charge mutationnelle pour les INNTIs ².

IV. Tests biologiques détectant la résistance

4.1 Les tests phénotypiques

Les tests phénotypiques de référence évaluent la réplication du virus d'un patient, isolé à partir de ses lymphocytes périphériques et cultivé en présence de concentrations croissantes d'ARV : cela permet une mesure directe de la résistance *in vitro*. Les résultats sont exprimés par le rapport entre la concentration du produit nécessaire pour inhiber de 50% (CI50) ou de 90% (CI90) la réplication virale de la souche considérée et celle nécessaire pour inhiber une souche sensible de référence. Il faut entre 2 et 4 semaines pour obtenir les résultats d'un test phénotypique, et un équipement particulier est requis, avec notamment un laboratoire de type L3. Cette technique a donc l'avantage de prendre en compte toutes les mutations présentes sur le génome viral, mais est complexe, longue et coûteuse.

Certaines firmes proposent des tests phénotypiques utilisant des virus recombinants. La région du gène *pol* du virus du patient est insérée dans le génome d'un virus qui va croître en culture. Il existe également des phénotypes « virtuels »: ce sont des phénotypes estimés à partir du génotype réalisé chez un patient et de phénotypes connus obtenus sur des souches aux profils génotypiques semblables. Ces tests sont donc inapplicables aux nouvelles molécules, et l'ensemble de la séquence n'est pas pris en

compte, ce qui supprime le principal intérêt du phénotype. Enfin, devant un profil génotypique rare, les résultats n'ont pas une bonne fiabilité.

En conclusion, les tests phénotypiques sont surtout intéressants au cours d'essais thérapeutiques et pour l'étude de la résistance aux nouvelles molécules pour lesquelles les données sont limitées.

4.2 Les tests génotypiques conventionnels

Il s'agit de l'analyse des mutations présentes dans les gènes de la TI, de la protéase, de l'intégrase, de la gp120 de la boucle V3 ou de la gp41, retrouvées classiquement par séquençage selon le principe de la méthode de Sanger, par comparaison avec une séquence non mutée.

L'ARN viral plasmatique est extrait puis est rétro-transcrit en ADN. Les gènes sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits de PCR sont alors séquencés sur séquenceurs automatiques. Les séquences ainsi obtenues sont comparées à une séquence de référence, dite « sauvage ». Chaque position connue comme étant associée à des mutations de résistance est lue. Un logiciel, qui tient compte des règles d'interprétations, présente le résultat.

La construction d'algorithmes d'interprétation repose sur des études de corrélation entre le profil de mutations et la réponse virologique vis-à-vis d'un ARV. Plusieurs algorithmes sont disponibles et mis à jour régulièrement comme l'américain

HIVdb (Stanford University Medical Center, CA, USA, <http://hivdb.stanford.edu>), et le français de l'ANRS AC11 (www.hivfrenchresistance.org, voir tableaux 6 à 10). Malheureusement, il n'y a pas de consensus entre les différents algorithmes, et les niveaux de rendus ne sont pas exactement les mêmes. L'algorithme utilisé en France permet de traduire le profil de mutations observé en «sensible», «résistance possible» ou «résistance» pour chaque ARV. On peut également établir la somme des molécules encore actives dans une combinaison thérapeutique : c'est le GSS ("Genotypic Sensitivity Score" : score de sensibilité génotypique). Les mutations sont définies par rapport à une séquence VIH-1 consensus de sous-type B, majoritaire en France, aux USA et dans les pays occidentaux mais qui ne concerne finalement que peu de patients infectés dans le monde.

Le principal défaut de cette technique est son manque de sensibilité : en effet, les variants minoritaires représentant moins de 20% de la population virale totale circulante au niveau plasmatique ne sont pas détectés. Par ailleurs, l'ensemble de la séquence génétique du virus n'est pas pris en compte. Un autre point faible est que seules les mutations connues, dont l'impact a été démontré *in vivo* et/ou *in vitro*, sont étudiées. Cependant, les séquences obtenues étant conservées, il est possible avec cette méthode de revenir sur les résultats du séquençage *a posteriori*. Comme pour les tests phénotypiques, cette technique est aussi limitée par la charge virale plasmatique qui doit être suffisamment élevée pour permettre une amplification. Malgré cela, le test génotypique est un outil efficace, rapide, standardisé et qui a démontré un intérêt dans la prise en charge des patients.

Il est recommandé de faire un génotypage dès le diagnostic, environ 10% des patients naïfs de traitement étant porteurs de virus résistants⁷⁰. Rappelons que, chez les personnes traitées, les tests de résistance doivent être réalisés lorsque le patient est encore sous le traitement dont l'efficacité est à étudier car une fois la « pression de sélection thérapeutique » levée, le virus résistant peut devenir suffisamment minoritaire pour ne plus être détecté par le test. Enfin, il a été montré qu'il faut tenir compte des mutations présentes sur les génotypes antérieurs⁹², et qu'il est important de réinterpréter les résultats des génotypes antérieurs avec les algorithmes les plus récents.

Il est aussi recommandé de déterminer le sous-type viral lors du premier test génotypique réalisé, en comparant la séquence génétique de la TI avec des séquences de référence.

Etapes du séquençage du VIH-1 selon le principe de Sanger

L'extraction de l'ARN plasmatique s'effectue classiquement de manière automatique ou semi-automatique. Après la lyse des échantillons, les acides nucléiques sont capturés par des particules de silices magnétiques. Un système d'aimant permet alors la fixation de la silice pour purifier les acides nucléiques qui sont ensuite libérés de celle-ci par une étape de chauffage. Enfin, la silice magnétique est séparée de l'éluat par le système d'aimant. Une étape de RT-PCR ("Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" pour Transcription Inverse et Réaction en chaîne par polymérisation) est alors effectuée sur les extraits, qui consiste en la transcription inverse de l'ARN viral plasmatique en ADN complémentaire et en l'amplification de ce dernier. Une deuxième

amplification est effectuée pour augmenter la sensibilité de la méthode: il s'agit de la PCR nichée (« Nested PCR ») qui utilise un second couple d'amorces liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon.

Au cours de la réaction de séquençage proprement dite, qui se déroule comme une PCR, la polymérase introduit aléatoirement des didéoxynucléotides (dd-NTP) interrupteurs de chaîne marqués par un fluorochrome (marqueur radioactif à l'origine). A chaque dd-NTP introduit, présents en quantité bien inférieure par rapport aux dNTP, la synthèse d'un brin d'ADN s'arrête. A la fin de la réaction, toutes les longueurs sont représentées par un dd-NTP fluorescents. Les quatre bases azotées du brin d'ADN séquencé sont caractérisées par quatre marqueurs fluorescents distincts. Les produits d'amplification vont alors migrer dans un capillaire qui les séparera en fonction de leur taille. Un séquenceur de gènes capillaire utilise des tubes capillaires de verre de seulement quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur, pour réaliser l'électrophorèse. Les signaux sortant de l'appareil sont ensuite analysés par un logiciel et rendus sous forme de chromatogrammes (pics de fluorescence).

4.3 Nouvelles techniques de séquençage

A côté des tests de séquençage "classiques" et des tests de séquençage dit à « haut débit », il existe depuis quelques temps déjà d'autres techniques permettant d'augmenter la sensibilité du séquençage et de détecter des VRMs, telles que le clonage.

Après insertion des produits de PCR dans un plasmide vecteur, des bactéries compétentes sont transformées, c'est-à-dire qu'il y a insertion du plasmide vecteur dans la bactérie. Chaque colonie forme ensuite un clone, qui est séquencé selon le principe de Sanger. La sensibilité dépend ainsi du nombre de clones obtenus. La PCR digitale (dPCR) permet elle-aussi d'améliorer la sensibilité des tests génotypiques: il s'agit d'une PCR quantitative en dilution limite, consistant en la séparation d'un l'échantillon en un grand nombre de fractions, chaque fraction contenant « 0 » ou « 1 » molécule. Après amplification et séquençage des produits de dPCR, il est possible d'identifier et même de quantifier précisément des variants minoritaires. Enfin, la PCR sélective d'allèle utilise des amorces correspondant soit aux codons sauvages, soit aux codons mutés; cette technique est maintenant d'intérêt limité. En effet, une seule mutation peut être étudiée à la fois.

Par ailleurs, les nouvelles techniques de séquençage, appelées séquençage haut débit, UDS ("Ultra-Deep Sequencing") ou NGS ("Next Generation Sequencing"), sont bien plus sensibles que les techniques classiques de séquençage et permettent la détection de variants minoritaires représentant approximativement 1% de la population virale. La puissance de ces technologies a notamment été démontrée dans le domaine du VIH ^{93,94}. Ces technologies offrent la possibilité d'étudier le génome entier après fragmentation de l'ADN (approche Shotgun), ou, de manière plus classique, d'étudier des fragments d'ADN après amplification de celui-ci (approche Amplicons). Différentes techniques existent, néanmoins, dans toutes les NGS, le processus se déroule en trois étapes. Le matériel génétique est d'abord extrait par des techniques courantes d'extraction et une librairie d'ADN est créée par PCR, constituée de morceaux d'ADN liés à des adaptateurs spécifiques. Ces adaptateurs vont par la suite immobiliser les fragments d'ADN sur une

surface solide plane ou sur des billes. Dans un deuxième temps, après séparation des différents fragments d'ADN, une amplification clonale crée des "clusters" de fragments d'ADN identiques. Enfin, les "clusters" sont séquencés et les signaux détectés de différentes manières selon les techniques : détection de fluorescence, de pyrophosphates (pyroséquençage) ou d'ions proton (conductimétrie). Les différents types de signaux sont ensuite convertis en séquences et analysés.

Les appareils NGS peuvent être distingués selon leur capacité de séquençage (profondeur) ou selon la longueur séquencée (couverture). Voici les principales NGS développées en virologie ces dernières années:

1. Le système de séquençage Illumina™ (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Des sondes complémentaires aux adaptateurs sont fixées sur une surface solide plane appelée "flowcell" et permettent ainsi d'immobiliser les fragments d'ADN de la librairie. Chaque fragment va subir une amplification clonale générant des "clusters" (figure 7). Le séquençage à proprement parlé consiste, comme la technique de Sanger, en l'incorporation d'un nucléotide terminateur de chaîne fluorescent complémentaire du brin modèle immobilisé. Ainsi la synthèse d'ADN s'interrompt (et la fluorescence correspondante au nucléotide est détectée), mais, contrairement au séquençage classique, celle-ci reprend après clivage d'une partie du nucléotide terminateur de chaîne. Les faux positifs sont le principal problème de cette technique, par incorporation de nucléotides non complémentaires ou par chevauchement des clusters, dispersés de manière aléatoire sur la "flowcell". Par ailleurs, ce système produit de courtes séquences (maximum 250 paires de bases), ce qui pose un problème lors de la recherche de lien entre les mutations. En revanche, la profondeur obtenue est excellente.

2. Le système de séquençage 454TM (Roche 454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA) qui prédominait en virologie jusqu'ici. Après obtention de la librairie de fragments d'ADN, ceux-ci vont être fixés à des billes par leurs adaptateurs. La deuxième étape constitue l'amplification clonale des fragments d'ADN attachés aux billes. Le caractère clonal de cette amplification est assuré par une séparation physique de ces billes hydrophiles mélangées au mix de PCR, au sein d'une émulsion huileuse : on parle de microréacteurs. Les billes enrichies sont ensuite récupérées et placées dans les puits d'une "PicoTiter Plate" (chaque puits ne pouvant contenir qu'une seule bille). Les fragments d'ADN de chaque bille sont alors séquencés par pyroséquençage. A chaque insertion d'un nucléotide lors de la synthèse du brin complémentaire, un pyrophosphate (PPI) est relargué. Ce PPI va être transformé en Adénosine 5' TriPhosphate (ATP) par une ATP sulfurylase, puis en signal lumineux par une luciférase (figure 8). Le signal lumineux est alors capté par un capteur CDD ("Charge-Coupled Device"). Après chaque ajout d'un nucléotide, un traitement par apyrase permet d'éliminer le surplus d'ATP, et le nucléotide suivant peut être incorporé. Le point faible de cette méthode est sans nul doute le taux élevé d'erreurs au niveau des homopolymères (difficulté à différencier des signaux identiques émis les uns à la suite des autres). Cette technique nécessite par ailleurs une formation pratique rigoureuse au vu des nombreuses étapes non automatisées, ce qui a été un grand frein à sa mise en place en routine. Néanmoins, avec des longueurs de lectures de 500 à 1000 paires de base, le système de séquençage 454TM présente l'avantage considérable de permettre l'étude du linkage d'un certain nombre de mutations. La technologie 454TM s'arrêtera courant 2016 ; elle sera sans doute par un autre système proposé par Roche Life Sciences.

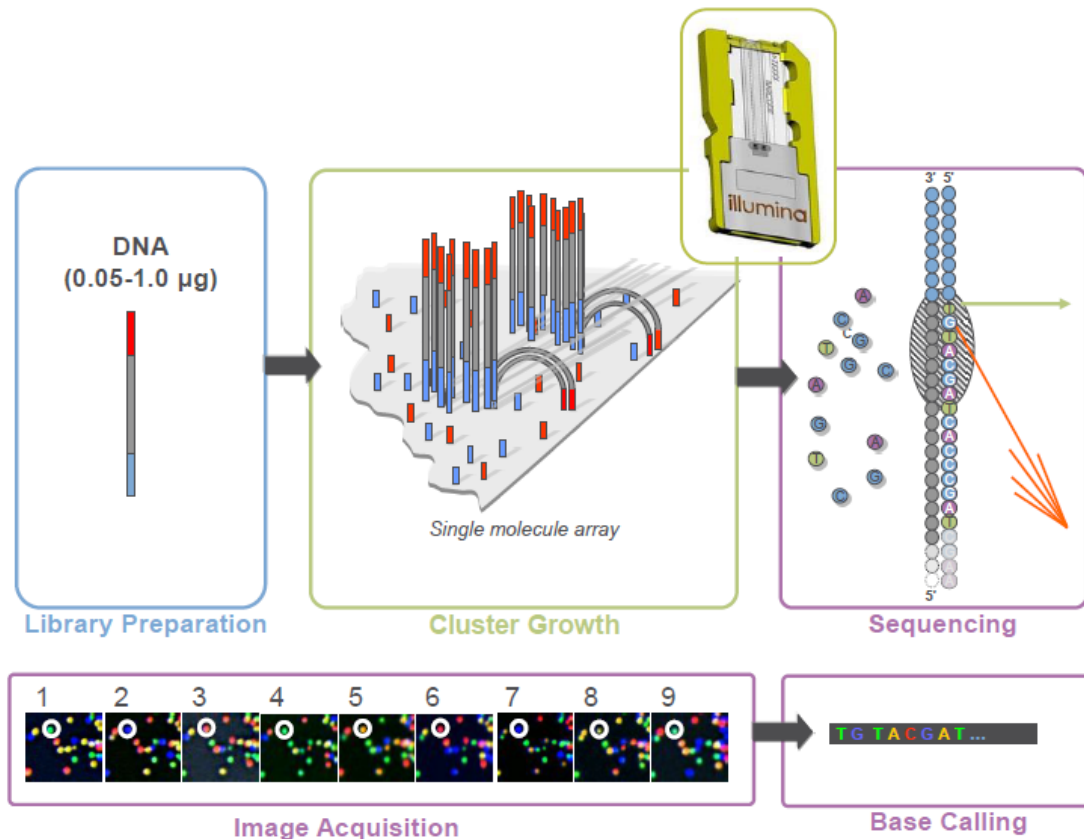


Figure 7. Etapes de la technique Illumina (Source Illumina)

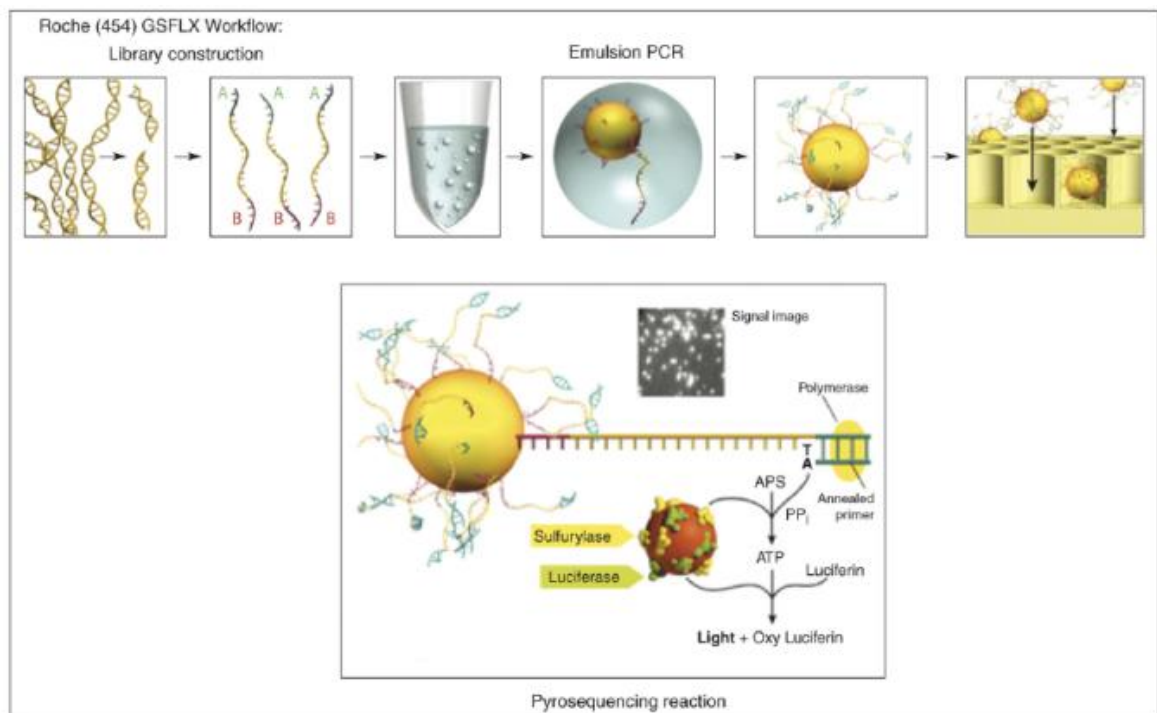


Figure 8. Etapes de la technique 454TM de Roche Life Sciences (Mardis 2008)

3. Enfin, le système Ion Torrent TM (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) peut également être cité, bien que très peu développé en virologie. Jusqu'à la réaction de séquençage proprement dite, les différentes étapes du protocole sont strictement identiques à celles du système de séquençage 454TM. Le séquençage est basé sur la détection de protons. En effet, à chaque insertion d'une base lors de la synthèse du brin complémentaire, un ion H⁺ est relargué et est détecté par conductimétrie. La variation de pH est ensuite traduite en un signal digital. L'inconvénient majeur reste actuellement la faible longueur de la séquence lue. Un taux élevé d'erreurs au niveau des homopolymères est également retrouvé. Néanmoins, elle a l'avantage théorique de présenter une technologie moins coûteuse.

Pour finir, nous nous devons de parler des séquenceurs de troisième génération qui vont arriver sur le marché dans le futur. Leur principale caractéristique est que le signal est donné en temps réel, c'est-à-dire que ce signal, qu'il soit une fluorescence (Pacbio RS, Pacific BiosciencesTM, Menlo Park, CA, USA), ou un courant électrique (Nanopore, Oxford Nanopore Technologies[®]), est monitoré durant la réaction enzymatique d'ajout de nucléotide. La préparation des échantillons est rapide, sans phase de pré-amplification (ce qui élimine les erreurs introduites lors de la PCR et la sélection de variants pour lesquels les amorces sont plus affines). De plus, les longueurs de lecture atteignent des records : plus de 10 000 paires de bases avec le système PacBio. Ce système détecte le signal de fluorescence lié à l'incorporation du nucléotide par 1 molécule d'ADN polymérase fixée au fond d'un puits au sein de petites unités appelées ZMW ("Zero Mode Waveguide"), qui amplifient fortement les signaux, et permettent de s'affranchir du bruit de fond (**figure9**). Le principe original du système Nanopore repose

sur la détection de l'interruption du courant électrique lors du passage de bases clivées à travers le nanopore, lors de la dépolymérisation du double brin d'ADN (signal relié à la taille des désoxyribonucléosides monophosphatés ; **figure 10**)⁹⁵.

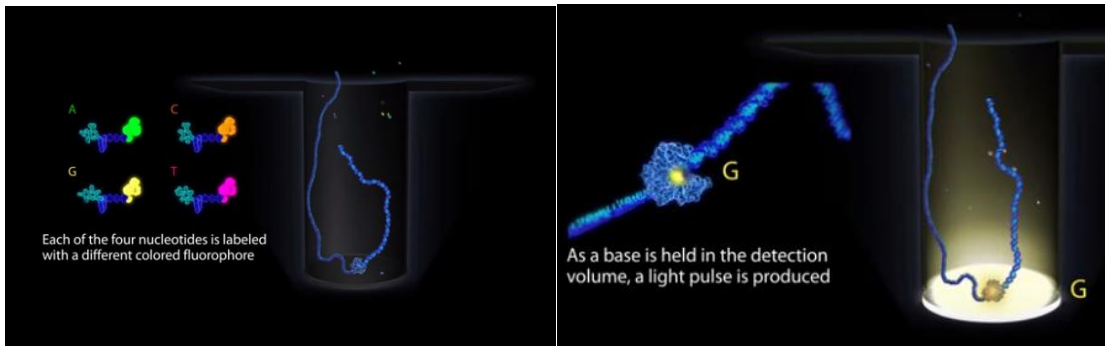


Figure 9. Fonctionnement du système PacBio (Source PacBio)

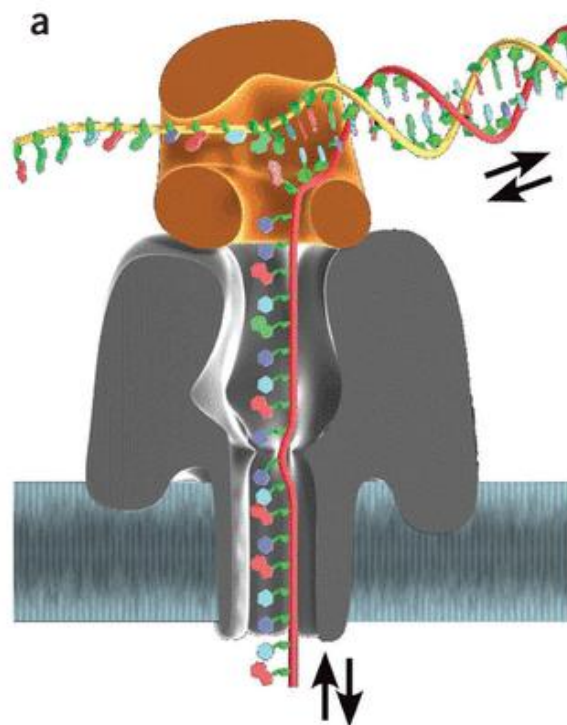


Figure 10. Schéma de nanopore (Schneider *et al.* 2012)

Les erreurs sont nombreuses en fin de séquence avec les NGS. Néanmoins, l'utilisation d'une polymérase haute fidélité, l'augmentation du nombre de lectures ainsi que l'étude de la qualité des séquences permettent de pallier à ces difficultés. Les NGS requièrent également des supports bioinformatiques d'analyse complexes, plus ou moins développés selon les domaines. La quantité de données générée est considérable et reste, pour l'instant, un frein à la généralisation de ces techniques, tout comme la "lourdeur" des protocoles de certaines techniques.

OBJECTIFS

La technique de séquençage selon la méthode de Sanger est d'une aide précieuse depuis de nombreuses années, sur laquelle les cliniciens, aidés des virologues, adaptent les traitements. Néanmoins, cette technique est limitée par son seuil de détection situé autour de 20% de la population virale, alors que l'impact des VRMs sur la réponse virologique commence à être connu. En effet, les mutations de résistance pour une molécule donnée sont produites avant que la molécule en question ne soit utilisée, et c'est sous « pression de sélection » que la souche va être sélectionnée. Cette variabilité génétique permet donc au virus de s'adapter rapidement aux conditions de l'environnement. Des données récentes montrent que des VRMs, même représentant un très faible pourcentage de la population virale, peuvent être une source d'échec virologique (cf. 3.9 Variants minoritaires et résistance aux antirétroviraux). La prise en compte de ces variants pourrait permettre de réduire encore le taux d'échec thérapeutique.

Après adaptation de la technique de séquençage 454TM (Roche 454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA) pour les gènes de la TI, de la protéase, et de l'intégrase du VIH, l'intérêt de l'utilisation de cette technique dans la prise en charge des patients infectés par le VIH-1 a été évalué lors des travaux de cette thèse. Les premiers travaux portent sur l'intérêt de l'utilisation de l'UDS chez les patients en situation d'échec virologique sous 2 combinaisons antirétrovirales très utilisées (TDF/FTC/EFV et TDF/FTC/RPV) au moment de l'échec. Nous avons comparé nos résultats à la méthode de séquençage selon Sanger afin d'étudier si la technique de 454TM permet de détecter des

VRMs supplémentaires et si cela aboutit à une évaluation plus fine de l'impact sur les traitements ultérieurs, notamment en ce qui concerne les INNTIs, rendant possible une meilleure adéquation entre le traitement de relai et la population virale circulante.

Dans un autre travail, notre objectif était d'étudier la prévalence de la résistance sur le gène de la protéase et de la TI chez des patients naïfs chroniquement infectés, par UDS *versus* Sanger, dans différentes catégories de groupe de transmission (patients HSH et patients hétérosexuels originaires d'Afrique sub-saharienne). En effet, en 2010/2011, la prévalence globale de virus portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux sur le gène de la protéase ou de la TI était de 9 % chez les patients naïfs chroniquement infectés en France (IC95% : 6.8-11.2). Il existait une relation entre les groupes à risque et la prévalence de la résistance transmise : les patients HSH infectés par un virus de sous-type B sont le plus fréquemment infectés par un virus résistant⁹⁶. Cela a été déterminé par la technique de séquençage classique de Sanger. Il est envisageable que cette différence soit encore plus importante avec l'utilisation de l'UDS. Le deuxième objectif de ce travail était de mesurer, en fonction du groupe de transmission, l'impact de ces VRMs sur la réponse virologique au traitement de première ligne.

Enfin, nous avons étudié le cas d'un patient en initiation de traitement chez qui des résultats de séquençage selon le principe de Sanger étaient discordants, afin de comprendre et d'illustrer le potentiel de ces techniques de séquençage haut débit.

RESULTATS

Article 1

J Antimicrob Chemother 2015 May ; 70(5):1503-6

Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing

Todesco E, Rodriguez C, Morand-Joubert L, Mercier-Darty M, Desire N, Wiriden M, Girard PM, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG.

Plusieurs études montrent que la prise en compte des VRMs permettrait de réduire le taux d'échec thérapeutique, notamment si on tient compte des VRMs de la classe des INNTIs chez les patients naïfs initiant un traitement (présence prédictive d'un risque d'échec thérapeutique en première ligne de traitement multiplié par 2,5 à 3 fois^{2,3}). En revanche, la présence de VRMs à l'échec, et donc l'impact des VRMs sur les traitements de relai, n'a été que peu étudié.

Nous avons séquencé les populations virales retrouvées chez 26 patients en situation de premier échec virologique sous TDF/FTC/EFV (défini par deux charges virales consécutives >50 copies/mL), par séquençage classique et séquençage haut débit (454TM; toute mutation supérieure à 1% était considérée). Les patients pouvaient avoir été prétraités, s'ils n'avaient jamais été en situation d'échec thérapeutique auparavant. Les patients étaient sous TDF/FTC/EFV depuis 11 mois en médiane. La charge virale médiane à l'échec était de 1228 copies/mL (13/26 des patients avaient une charge virale < 1000 copies/mL à l'échec). Le nombre médian de lymphocytes T CD4 + était de 369/mm³.

Ce travail nous a permis de détecter des variants de résistance supplémentaires chez 38.5% des 26 patients grâce à la technique UDS versus Sanger, avec un impact potentiel sur le choix du traitement de relai. En effet, une diminution du GSS ("Genotypic Sensitivity Score") était observée pour 6 d'entre eux (23.1%). En analyse univariée, la présence de VRMs était associée au temps de traitement par TDF/FTC/EFV et, non significativement, avec des lignes précédentes de traitement. En analyse multivariée, une tendance était observée entre le fait d'avoir été prétraité et la présence de VRMs.

De façon intéressante, les mutations de résistance détectées uniquement par UDS touchaient principalement la classe des INTIs, alors que la classe des INNTIs était déjà largement affectée par des mutations détectées par les 2 techniques. Les VRMs retrouvés étaient corrélés aux traitements antérieurs ou au traitement par TDF/FTC/EFV (avec notamment 2 mutations K65R détectées chez des patients en situation de 1^{ère} ligne de traitement). L'analyse par UDS des faibles charges virales (<1000 copies/mL) se montrait également intéressante et a mis en évidence des mutations supplémentaires dans 6/13 cas. Les faibles charges virales ne sont en général pas analysées pas les techniques NGS du fait de la distribution stochastique de leurs échantillons : il semble néanmoins intéressant de les étudier.

Ces résultats renforcent des données récemment publiées ⁹⁷ et apportent un argument supplémentaire en faveur d'une utilisation du séquençage haut débit dans les situations d'échec de traitement INTIs + INNTIs, même en cas de charge virale faible. Alors que l'apport de l'UDS avant la première ligne thérapeutique concerne essentiellement la classe des INNTIs, il se pourrait que l'intérêt de ces techniques se porte sur d'autres classes, dont celle des INTIs, lors de l'échec virologique.

Article 2

Article soumis pour publication dans J Acquir Immune Defic Syndr
**Presence of Minority Resistant Variants After Failure to Tenofovir,
Emtricitabine and Rilpivirine Regimen.**

Todesco E, Surgers L, Marcelin AG, Calvez V, Meynard JL, Morand-Joubert L.

La RPV est une molécule de 2^{ème} génération de la classe des INNTIs largement utilisée. Pourtant, peu de données existent sur son utilisation en conditions de « vraie vie », et encore moins dans le domaine de la résistance détectée par UDS.

Nous avons étudié la présence de VRMs chez des patients en situation d'échec virologique après inclusion dans une étude de "switch" thérapeutique vers TDF/FTC/RPV. Parmi les 155 patients dont la charge virale VIH-1 était indétectable avant le "switch" pour TDF/FTC/RPV, un séquençage conventionnel avant le changement de traitement a été réalisé chez 118 d'entre eux et des mutations induisant la résistance aux molécules suivantes étaient observées : TDF/FTC/RPV (n=1), TDF/FTC (n=3), FTC (n=4) et EFV/NVP (n=6 : 3 mutations K103N isolées et 2 mutations K103N associées avec la mutation M184I/V, 1 mutation G190A).

Les quelques échecs sous TDF/FTC/RPV observés sont survenus rapidement (dans les 3 mois ; n=4 ; charge virale >20 copies/ml). Chez tous ces patients, une mutation de résistance à la NVP et à l'EFV était retrouvée avant le "switch" (3 mutations K103N, 1 mutation G190A). De plus, une mutation M184I/V était détectée dans 2 des 3 échantillons présentant une mutation K103N. Une mutation Y181C (VRM : 9.8%) a été détectée à l'échec chez l'un de ces 2 patients. A l'échec, il a également été retrouvé deux

VRMs (culot globulaire ; ARN plasmatique non amplifiable) pour le patient chez lequel avait été détectée une mutation K103N isolée avant le changement de traitement, à savoir les mutations M184I (1.2%) et M230I (2.0%). Ces mutations peuvent être dues à l'action d'APOBEC et pourraient être portées par des virus défectifs. En effet, la majorité des séquences présentaient des codons stop. Néanmoins, il a été démontré que même à un niveau sublétalement, APOBEC peut induire de la résistance par recombinaison avec d'autres séquences⁹⁸.

De façon intéressante, l'association des mutations K103N et M184V était retrouvée chez 3 des échecs virologiques sous TDF/FTC/RPV. La mutation M184V, isolée, a un impact bien connu sur l'efficacité du FTC alors que la mutation K103N, qui impacte les molécules de 1^{ère} génération de la classe des INNTIs, n'est pas associée à une résistance à la RPV selon les données de la littérature. Néanmoins, sur une trithérapie déjà fragilisée, il est possible que la mutation K103N facilite l'émergence de VRMs à la RPV.

Article 3

Article soumis pour publication dans J Antimicrob Chemother
**UltraDeep Sequencing Interest in the Study of Transmitted Drug
Resistance among Men having Sex with Men and Heterosexual
Population**

Todesco E, Charpentier C, Bertine M, Wirden M, Storto A, Desire N, Grude M, Sayon S, Yazdanpanah Y, Katlama C, Descamps D, Calvez V, Marcelin AG.

En 2010/2011, la prévalence globale de virus portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux sur le gène de la protéase ou de la transcriptase inverse était de 9 % chez les patients naïfs chroniquement infectés en France (IC95% : 6.8-11.2) et une relation était observée entre les groupes à risque groupe de transmission et la prévalence de la résistance transmise : les patients HSH infectés par un virus de sous-type B étant les plus fréquemment infectés par un virus résistant ⁹⁶.

Nous avons étudié la prévalence de la résistance sur le gène de la protéase et de la TI chez 70 patients HSH et 70 patients hétérosexuels infectés par le VIH-1 et naïfs de traitement, par UDS (454TM) *versus* Sanger. Les mutations apparaissant dans la liste consensus pour la surveillance génotypique de la TDR ont été prises en compte ⁸⁸.

Une plus grande prévalence de mutations de résistance primaire a été observée avec l'utilisation de NGS dans les deux groupes (18.6% vs 4.3% en Sanger chez les patients HSH; 22.8% vs 7.1% en Sanger chez les patients hétérosexuels), avec une prévalence plus élevée de mutations touchant les INTIs dans le groupe des patients hétérosexuels (14.8% vs 4.3% chez les patients HSH (p=0.04)). Nous avons émis certaines hypothèses pour

expliquer ce résultat chez les patients hétérosexuels, qui étaient originaires d'Afrique subsaharienne : soit ces patients avaient déjà été exposés aux antirétroviraux, sciemment ou non, soit la généralisation du traitement en Afrique (associée parfois à des ruptures d'approvisionnement problématique sur le plan de la résistance) est à l'origine de la prévalence de mutations plus élevée dans ce groupe vis-à-vis des INTIs. Nous avons par ailleurs retrouvé en UDS une tendance à une plus grande prévalence de la TDR au sein du sous-groupe des patients HSH lorsque ceux-ci étaient infectés par un sous-type B (26.2% (n=11/42) versus 7.1% (n=2/28) ; p=0.06), conformément à la littérature.

Sur les 140 patients de cette étude, 113 ont initié un traitement et ont été suivis à 6 et 12 mois. Huit d'entre eux ont présenté un échec virologique : aucun ne présentait de mutation ayant un impact sur le traitement avant l'instauration de celui-ci.

Ce travail met en avant la sensibilité des techniques NGS et expose quelques disparités de résistance transmise entre les groupes de transmission étudiés. L'impact des VRMs a été difficile à évaluer dans ce travail car peu impactaient le traitement mis en place et plus de la moitié des patients recevait un traitement contenant un inhibiteur de protéase boosté, pouvant masquer l'effet des variants minoritaires. Enfin, il faut noter que la liste consensus pour la surveillance génotypique de la TDR ne tient pas compte de certaines mutations telles que les mutations E138A et K65E, retrouvés chez certains patients de cette étude.

Article 4

J Antimicrob Chemother 2015 Jun ; 70(6):1919-20.

Ultradeep sequencing in the therapeutic management of HIV-1 infection at treatment initiation

Todesco E, Mercier-Darty M, Jung M, Bottero J, Boyd A, Marcelin AG, Calvez V, Morand-Joubert L

Environ 10% des virus séquencés chez des patients naïfs de traitement présentent des mutations transmises de résistance. Sans pression de sélection, une perte progressive de ces mutations est observée, surtout si leur impact sur la capacité répliquative du virus est important.

Nous avons étudié par séquençage haut débit les populations virales d'un patient infecté par le VIH-1 et non traité, dont les séquençages conventionnels selon le principe de Sanger étaient discordants à une semaine d'intervalle.

Le patient a été dépisté positivement pour le VIH-1 dans un centre de dépistage, alors qu'il ne présentait aucun symptôme clinique. Au décours d'une première consultation, une charge virale de $5.6 \log_{10}$ copies/mL a été mesurée, et le séquençage de routine détectait des mutations de résistance en « mixture » sur le gène de la TI : M184M/V, K103N/R/S et Y188Y/L. Une semaine plus tard, la charge virale est de $5.4 \log_{10}$ copies/mL et un second séquençage de routine est demandé, ne détectant que la mutation K103N/R/S. Ces 2 échantillons ont été analysés en UDS. Dans le 1^{er} échantillon, les mutations déjà détectées par le séquençage selon le principe de Sanger sont retrouvées, et des VRMs supplémentaires sont également détectés (M41L, V106I, V179I).

Dans l'échantillon prélevé la semaine suivante, toutes les mutations précédemment trouvées sont détectées, exceptée la mutation V106I (dont le taux était de 1.3% sur le 1^{er} prélèvement). Les taux des mutations M184V et Y188L ont largement diminué, et sont en-dessous du seuil de détection de la technique effectuée en routine (20%).

Les données de phylogénie n'ont pas montré de surinfection et le western-blot ainsi que le test d'avidité des anticorps ne plaident pas pour une infection récente. Les dosages n'ont pas détecté de trace de prise d'ARV.

L'UDS nous permet ici d'apprécier la forte diminution du taux d'une mutation telle que la M184V, bien connue pour impacter la capacité répliquative du virus^{99,100}, alors que la mutation K103N, qui n'a pas cette caractéristique⁵⁷, persiste au même taux. L'UDS permet ainsi d'expliquer certaines situations complexes, et de détecter plus durablement des mutations dont le taux chute.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les NGS changent, petit à petit, l'approche des laboratoires vis-à-vis du séquençage. Il s'agit d'une évolution technologique importante, qui peut changer la prise en charge des patients dans différentes spécialités grâce à une sensibilité très augmentée: en infectiologie, avec par exemple la recherche de résistance chez des souches de *Mycobacterium tuberculosis*, mais également en hématologie avec l'étude de la maladie résiduelle notamment, ou en génétique humaine. La génétique humaine a d'ailleurs été précurseur dans l'utilisation des NGS. L'arrivée en virologie des NGS a été plus tardive et l'utilisation en pratique courante n'est pas encore envisageable actuellement.

En effet, les problématiques sont différentes selon les spécialités : par exemple, la recherche de variants minoritaires est nécessaire en virologie. Il s'agit de la plus-value apportée par ces nouvelles technologies à cette spécialité. La quasi-espèce virale a en effet une capacité mutationnelle considérable afin de s'adapter à son environnement. La sensibilité des NGS permet la détection des VRMs de l'ordre de 1%, alors que le séquençage conventionnel selon le principe de Sanger présente un seuil de détection autour de 20%, et est donc incapable de détecter les VRMs. D'autres techniques permettent la détection des VRMs, telles que le clonage ou la PCR sélective, mais elles sont moins puissantes et/ou très difficiles à mettre en œuvre. Néanmoins, la demande d'un seuil de détection très bas et la recherche de VRMs par UDS requiert des performances informatiques de traitement et d'analyse de données considérables,

palliant aux défauts des différentes techniques. Il faut en effet éliminer les faux positifs, or aucun logiciel "clef en main" n'est pour l'instant disponible sur le marché.

D'autre part, la virologie est un domaine dans lequel le lien entre les mutations est étudié et est pertinent dans la prise en charge des patients. Effectivement, si chaque molécule d'un traitement vise une population virale particulière porteuse de mutations différentes, l'apparition d'un clone présentant toutes les mutations à la fois peut remettre en cause l'efficacité de l'association. La technologie 454TM (Roche 454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA) permet cette étude mais s'arrêtera fin 2016. Pour le moment, aucune autre technologie n'est capable de fournir cette information car les longueurs de lecture sont trop petites (de l'ordre de 150 à 250 paires de bases pour la technologie IlluminaTM (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) par exemple. Ce point nous fait revenir à la lourdeur informatique de ces systèmes qui se pose généralement et à laquelle la recherche de mutations très localisées échappe : les faibles longueurs de lecture nécessitent qu'un logiciel les ré-assemble si l'on veut étudier un gène plus grand que la longueur de lecture.

Néanmoins, le glissement vers les NGS est amorcé et est annoncé pour une utilisation en pratique courante dans les prochaines années. L'apport de ces techniques n'est pas clair dans tous les contextes ; certaines situations restent en effet à évaluer.

La seule situation sans controverse est celle de la première ligne de traitement comportant un INNTI. Il est bien démontré que la présence de VRMs à cette classe avant traitement multiplie le risque d'échec virologique par 2.5 à 3 fois ^{2,3}. La recherche de variants minoritaires utilisant le corécepteur CXCR4 avant traitement par MVC est

également une très bonne indication. L'impact des VRMs aux INTIs reste plus controversé, malgré quelques données mettant en évidence un nombre élevé d'échecs virologiques lorsque des mutations étaient détectées avant traitement. Les VRMs aux IPs, très peu étudiés, semblent avoir peu d'intérêt, alors que ceux affectant la classe des inhibiteurs d'intégrase doivent être étudiés davantage. La situation avant traitement est ainsi la plus étudiée. Lors de cette thèse, nous avons d'ailleurs étudié la résistance transmise chez deux groupes de transmission : des patients HSH et des patients hétérosexuels originaires d'Afrique subsaharienne, infectés par le VIH-1, récemment diagnostiqués et naïfs de traitement. Les résultats ont montré une résistance transmise plus importante chez les patients infectés par le sous-type B parmi les HSH (conformément à la littérature), mais également plus de VRMs aux INTIs chez les patients hétérosexuels par rapport aux patients HSH. Il s'agit peut être du reflet de l'augmentation du nombre de patients traités en Afrique subsaharienne (associée aux problèmes de rupture d'approvisionnement en traitement, favorisant la résistance) ou de patients préalablement exposés. L'impact des VRMs a été difficile à évaluer dans ce travail car aucun des virus retrouvé chez les huit patients en situation d'échec virologique après l'initiation d'un traitement ne présentait de mutation ayant un impact sur le traitement avant l'instauration de celui-ci, et plus de la moitié des patients recevait un traitement contenant un inhibiteur de protéase boosté. Néanmoins, la résistance transmise a un impact direct sur le choix de la première ligne thérapeutique et l'UDS a certainement ici une indication judicieuse. En effet, l'UDS permet de rattraper en situation chronique les mutations qui disparaissent au cours du temps, souvent à cause de l'impact qu'elles peuvent avoir sur la capacité répliquative du virus. Le virus se débarrasse des mutations gênantes comme la M184V par exemple, qui peuvent cependant ré-émerger.

Par ailleurs, peu d'études se sont intéressées à l'impact de VRMs lors de l'échec thérapeutique. Notre travail mené chez des patients en situation de premier échec virologique sous TDF/FTC/EFV a mis en évidence des VRMs touchant principalement les INTIs, alors que les mutations aux INNTIs étaient déjà détectées par le séquençage classique. L'impact des VRMs lors de cette situation reste à évaluer davantage. Si ces variants résistants sont responsables de l'échec virologique, on peut se demander pourquoi ils ne sont pas retrouvés de façon majoritaire et pourquoi la population majoritairement détectée est une population virale sensible au traitement. Il est ainsi possible qu'une utilisation des NGS au seuil de détection de 1% ne soit pas toujours nécessaire. Peut-être que dans certaines situations, l'étude des variants qui représentent plus de 10% de la population virale est suffisante, arbitrairement. Néanmoins, ces VRMs, qui étaient corrélés aux traitements antérieurs dans ce travail, ont peut être un impact sur les traitements ultérieurs. Ceci mérite d'être étudié plus précisément. En effet, la thérapeutique se tourne actuellement vers l'allègement thérapeutique et ses nombreux atouts. Sous bi-thérapies (TDF/FTC, 3TC/DTG, RPV/DTG, ou encore 3TC/ATV), il est envisageable que les VRMs auront la possibilité d'émerger avec plus de facilité. L'idéal serait d'étudier la dynamique des VRMs et de surveiller leur potentielle émergence avant même que celle-ci n'entraîne l'échec. Malheureusement, la nécessité d'amplification du virus impose des limites techniques. De plus, cela signifierait une surveillance continue des patients. Ce travail a également montré que la recherche de VRMs est possible et intéressante sur des charges virales faibles. De part la distribution aléatoire retrouvée dans les échantillons de faibles charges virales, il est possible que certains VRMs ne soient pas détectés (loi de Poisson). Il était admis jusqu'ici que l'analyse par UDS des charges virales < 1000 copies/mL était inutile. Les populations virales sont alors, en effet,

séquencées un grand nombre de fois. Néanmoins, lors de ce travail, des VRMs ont été détectés chez 6 des 13 charges virales < 1000 copies/mL.

Ainsi, selon la situation clinique, il faudra peut-être définir des seuils différents pour une utilisation optimisée. La question de seuils différents selon les mutations a également été posée, ce qui complexifierait encore les choses. Le paradoxe est donc le suivant : il nous faut des données pour étudier et clarifier les contextes intéressants, mais, sans argument fort sur l'intérêt du NGS, il est difficile de convaincre en faveur de l'implémentation de ces nouveaux systèmes. Cependant, le prix de ces technologies baisse et atteindra certainement le prix du séquençage selon le principe de Sanger d'ici peu de temps. D'autre part, l'automatisation des NGS et l'analyse bioinformatique se développent. L'analyse fine et la clarification de l'intérêt des NGS pourront ainsi se faire d'après les données accumulées après passage dans la pratique courante au sein des laboratoires. En effet, à prix égal, il est intéressant d'aller vers les NGS, quitte à utiliser nos anciens seuils de détection lors de situations encore confuses. Enfin, l'UDS offre des perspectives variées et encore non exploitées telles que l'étude du VIH-1 proviral dans les "Peripheral Blood Mononuclear Cell" (PBMCs) avant "switch" ou la phylogénie. Lors de notre travail sur la résistance transmise dans différents groupes de transmission, une sous-étude sur l'analyse phylogénétique des séquences obtenues par UDS des virus infectant les patients HSH a été débutée. En effet, entre la proximité géographique de ces patients et la puissance des techniques UDS, il est possible que la phylogénie moléculaire nous révèle la présence de clusters de transmission au sein de ce groupe. D'autre part, l'UDS peut s'appliquer à d'autres virus, tel le virus de l'hépatite C dont la thérapeutique révolutionne actuellement le pronostic. La méta-génomique est également

une approche prometteuse, à laquelle l'avènement de l'UDS apporte puissance et efficacité.

Pour conclure, les NGS sont des techniques qui vont progressivement remplacer le séquençage selon le principe de Sanger, et dont il conviendra de définir les conditions d'utilisation en fonction des situations cliniques. La profondeur du séquençage obtenu par UDS nous offre une sensibilité toute nouvelle, permettant certainement une meilleure prise en charge des patients, ainsi que des perspectives d'utilisation très variées et prometteuses.

BIBLIOGRAPHIE

1. UNAIDS. Available at: <http://www.unaids.org/>. Accessed October 5, 2015.
2. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, *et al.* Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA J Am Med Assoc* 2011; **305**: 1327–35.
3. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, *et al.* Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 930–40.
4. InVS / Accueil. Available at: <http://www.invs.sante.fr/>. Accessed September 12, 2015.
5. Yeni P. *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH; rapport 2010. Recommandations du groupe d'experts.* 2010.
6. Girard PM, Katlama C, Pialoux G. *VIH.* Doin, 2011; 2011.
7. Huraux JM, Agut H, Nicolas JC, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale.* ESTEM, 2003
8. 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.
9. Meloni ST, Kim B, Sankalé J-L, *et al.* Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol* 2004; **78**: 12438–45.
10. Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS Lond Engl* 2002; **16 Suppl 4**: S3–16.
11. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989; **63**: 1455–9.
12. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; **15**: 871–2.
13. Damond F, Worobey M, Campa P, *et al.* Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; **20**: 666–72.
14. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006; **313**: 523–6.

15. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; **312**: 767–8.
16. Lekkerkerker AN, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr HIV Res* 2006; **4**: 169–76.
17. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, *et al.* Lymphoid Organs Function as Major Reservoirs for Human Immunodeficiency Virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 9838–42.
18. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 3879–84.
19. Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, *et al.* Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997; **71**: 6305–14.
20. Hedskog C, Mild M, Albert J. Transmission of the X4 phenotype of HIV-1: is there evidence against the ‘random transmission’ hypothesis? *J Infect Dis* 2012; **205**: 163–5.
21. Michel F, Crucifix C, Granger F, *et al.* Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *EMBO J* 2009; **28**: 980–91.
22. Mbisa JL, Bu W, Pathak VK. APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J Virol* 2010; **84**: 5250–9.
23. Fourati S, Malet I, Binka M, *et al.* Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *AIDS Lond Engl* 2010; **24**: 2313–21.
24. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008; **214**: 231–41.
25. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; **12**: 1365–71.
26. vih.org | au service de la lutte contre le sida. Available at: <http://www.vih.org/>. Accessed June 12, 2012.
27. Morlat P. *Prise en charge médicale des patients vivant avec le VIH*. 2013.
28. Lewden C, Chene G, Morlat P, *et al.* HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2007; **46**: 72–7.
29. INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, *et al.* Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med* 2015; **373**: 795–807.

30. Morlat P. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Actualisations 2014 du rapport 2013.pdf. Available at: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/experts-vih_actualisations2014.pdf. Accessed October 5, 2015.
31. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Actualisations 2014 du rapport 2013.pdf. Available at: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/experts-vih_actualisations2014.pdf. Accessed October 5, 2015.
32. Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, *et al.* Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med* 2006; **354**: 251–60.
33. Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, *et al.* Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2095–106.
34. Cohen CJ, Molina J-M, Cassetti I, *et al.* Week 96 efficacy and safety of rilpivirine in treatment-naïve, HIV-1 patients in two Phase III randomized trials. *AIDS Lond Engl* 2013; **27**: 939–50.
35. Molina J-M, Andrade-Villanueva J, Echevarria J, *et al.* Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study. *Lancet* 2008; **372**: 646–55.
36. Walmsley S, Aghajanian A, Slim J, *et al.* Gemini: a noninferiority study of saquinavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir as initial HIV-1 therapy in adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2009; **50**: 367–74.
37. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, *et al.* Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. *AIDS Lond Engl* 2010; **24**: 2365–74.
38. Arastéh K, Yeni P, Pozniak A, *et al.* Efficacy and safety of darunavir/ritonavir in treatment-experienced HIV type-1 patients in the POWER 1, 2 and 3 trials at week 96. *Antivir Ther* 2009; **14**: 859–64.
39. Saag M, Goodrich J, Fätkenheuer G, *et al.* A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment-experienced patients infected with non-R5 HIV-1. *J Infect Dis* 2009; **199**: 1638–47.
40. Soulié C, Lambert-Niclot S, Fofana DB, *et al.* Frequency of amino acid changes associated with resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in R5- and X4-tropic HIV-1 subtype B. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1243–5.
41. Lennox JL, DeJesus E, Berger DS, *et al.* Raltegravir versus Efavirenz regimens in treatment-naïve HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2010; **55**: 39–48.

42. Sax PE, DeJesus E, Mills A, *et al.* Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet Lond Engl* 2012; **379**: 2439–48.
43. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, *et al.* Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med* 2010; **363**: 2587–99.
44. Baeten JM, Donnell D, Ndase P, *et al.* Antiretroviral Prophylaxis for HIV Prevention in Heterosexual Men and Women. *N Engl J Med* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784037>. Accessed July 30, 2012.
45. Devienne-Garrigue I, Pellegrin I, Denisi R, *et al.* Foscarnet decreases HIV-1 plasma load. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc* 1998; **18**: 46–50.
46. Charpentier C, Laureillard D, Sodqi M, *et al.* Foscarnet salvage therapy efficacy is associated with the presence of thymidine-associated mutations (TAMs) in HIV-infected patients. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2008; **43**: 212–5.
47. Tachedjian G, Mellors J, Bazmi H, Birch C, Mills J. Zidovudine resistance is suppressed by mutations conferring resistance of human immunodeficiency virus type 1 to foscarnet. *J Virol* 1996; **70**: 7171–81.
48. Canestri A, Ghosn J, Wirden M, *et al.* Foscarnet salvage therapy for patients with late-stage HIV disease and multiple drug resistance. *Antivir Ther* 2006; **11**: 561–6.
49. Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, *et al.* 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2011; **19**: 156–64.
50. Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry (Mosc)* 1998; **37**: 15908–17.
51. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 2001; **75**: 4832–42.
52. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* 1999; **4**: 35–43.
53. Naeger LK, Miller MD. Mechanisms of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: is it all figured out? *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000 2001; **2**: 335–9.
54. Wainberg MA. The impact of the M184V substitution on drug resistance and viral fitness. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; **2**: 147–51.

55. Parikh UM, Barnas DC, Faruki H, Mellors JW. Antagonism between the HIV-1 reverse-transcriptase mutation K65R and thymidine-analogue mutations at the genomic level. *J Infect Dis* 2006; **194**: 651–60.
56. Miller MD. K65R, TAMs and tenofovir. *AIDS Rev* 2004; **6**: 22–33.
57. Gianotti N, Galli L, Boeri E, *et al.* In vivo dynamics of the K103N mutation following the withdrawal of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in Human Immunodeficiency Virus-infected patients. *New Microbiol* 2005; **28**: 319–26.
58. Dykes C, Fox K, Lloyd A, Chiulli M, Morse E, Demeter LM. Impact of clinical reverse transcriptase sequences on the replication capacity of HIV-1 drug-resistant mutants. *Virology* 2001; **285**: 193–203.
59. Kulkarni R, Babaoglu K, Lansdon EB, *et al.* The HIV-1 reverse transcriptase M184I mutation enhances the E138K-associated resistance to rilpivirine and decreases viral fitness. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2012; **59**: 47–54.
60. von Wyl V, Yerly S, Böni J, *et al.* Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combination antiretroviral treatment: a comparison of different regimen types. *Arch Intern Med* 2007; **167**: 1782–90.
61. Fun A, Wensing AMJ, Verheyen J, Nijhuis M. Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology* 2012; **9**: 63.
62. Sutherland KA, Goodall RL, McCormick A, *et al.* Gag-Protease Sequence Evolution Following Protease Inhibitor Monotherapy Treatment Failure in HIV-1 Viruses Circulating in East Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015.
63. Moore JP, Kuritzkes DR. A pièce de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; **4**: 118–24.
64. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, *et al.* Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* 2008; **82**: 764–74.
65. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 1989; **243**: 1731–4.
66. Ghosn J, Wirden M, Ktorza N, *et al.* No benefit of a structured treatment interruption based on genotypic resistance in heavily pretreated HIV-infected patients. *AIDS Lond Engl* 2005; **19**: 1643–7.
67. Lawrence J, Mayers DL, Hullsiek KH, *et al.* Structured treatment interruption in patients with multidrug-resistant human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 2003; **349**: 837–46.
68. Assoumou L, Descamps D, Yerly S, *et al.* Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL in 2009: a French nationwide study. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1400–5.

69. Costagliola D, Descamps D, Assoumou L, *et al.* Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients: a French nationwide study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2007; **46**: 12–8.
70. Descamps D, Assoumou L, Chaix M-L, *et al.* National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-2011. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2626–31.
71. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, *et al.* Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 2009; **199**: 693–701.
72. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, *et al.* Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PLoS One* 2010; **5**: e10952.
73. Vignoles M, Barboni G, Agosti MR, *et al.* Evaluation of minority populations of HIV type-1 with K103N and M184V drug resistance mutations among children in Argentina. *Antivir Ther* 2009; **14**: 1175–81.
74. Metzner KJ, Rauch P, von Wyl V, *et al.* Efficient suppression of minority drug-resistant HIV type 1 (HIV-1) variants present at primary HIV-1 infection by ritonavir-boosted protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; **201**: 1063–71.
75. Fisher R, van Zyl GU, Travers SAA, *et al.* Deep sequencing reveals minor protease resistance mutations in patients failing a protease inhibitor regimen. *J Virol* 2012; **86**: 6231–7.
76. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, *et al.* Virologic Failures on Initial Boosted-PI Regimen Infrequently Possess Low-Level Variants with Major PI Resistance Mutations by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS One* 2012; **7**: e30118.
77. Codoñer FM, Pou C, Thielen A, *et al.* Dynamic escape of pre-existing raltegravir-resistant HIV-1 from raltegravir selection pressure. *Antiviral Res* 2010; **88**: 281–6.
78. Liu J, Miller MD, Danovich RM, *et al.* Analysis of low-frequency mutations associated with drug resistance to raltegravir before antiretroviral treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1114–9.
79. Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, *et al.* Study of genotypic and phenotypic HIV-1 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: a refined analysis by ultra-deep 454 pyrosequencing. *J Infect Dis* 2012; **205**: 557–67.
80. Ceccherini-Silberstein F, Van Baelen K, Armenia D, *et al.* Secondary integrase resistance mutations found in HIV-1 minority quasispecies in integrase therapy-naïve patients have little or no effect on susceptibility to integrase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3938–48.

81. Gibson RM, Weber J, Winner D, Miller MD, Quiñones-Mateu ME. Contribution of human immunodeficiency virus type 1 minority variants to reduced drug susceptibility in patients on an integrase strand transfer inhibitor-based therapy. *PloS One* 2014; **9**: e104512.
82. Archer J, Braverman MS, Taillon BE, *et al.* Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS Lond Engl* 2009; **23**: 1209–18.
83. Swenson LC, Mo T, Dong WWY, *et al.* Deep Sequencing to Infer HIV-1 Co-Receptor Usage: Application to Three Clinical Trials of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients. *J Infect Dis* 2011; **203**: 237–45.
84. Rodriguez C, Soulié C, Marcelin A-G, *et al.* HIV-1 Coreceptor Usage Assessment by Ultra-Deep Pyrosequencing and Response to Maraviroc. *PloS One* 2015; **10**: e0127816.
85. Le T, Chiarella J, Simen BB, *et al.* Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PloS One* 2009; **4**: e6079.
86. Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C, *et al.* Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2090–6.
87. Cunningham E, Bibby D, Lythgow K, *et al.* Enhanced surveillance of HIV-1 transmitted drug resistance and transmission clusters in recently infected UK MSM. *Antivir Ther* 2014; **19 Suppl 1**: A30.
88. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, *et al.* Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS One* 2009; **4**: e4724.
89. HIV Drug Resistance Database. Available at: <http://hivdb.stanford.edu/>. Accessed October 6, 2015.
90. 2014-drug-resistance-mutations-hiv-1-figure.pdf. Available at: <https://www.iasusa.org/sites/default/files/2014-drug-resistance-mutations-hiv-1-figure.pdf>. Accessed October 6, 2015.
91. Garcia-Diaz A, McCormick A, Booth C, *et al.* Analysis of transmitted HIV-1 drug resistance using 454 ultra-deep-sequencing and the DeepChek(®)-HIV system. *J Int AIDS Soc* 2014; **17**: 19752.
92. Flandre P, Descamps D, Morand-Joubert L, *et al.* Comparison of the use of last genotype versus all past genotypes to classify patients according to resistance algorithms. *EACS* 2009: PS 12/4.
93. 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.

94. Liang B, Luo M, Scott-Herridge J, *et al.* A comparison of parallel pyrosequencing and sanger clone-based sequencing and its impact on the characterization of the genetic diversity of HIV-1. *PloS One* 2011; **6**: e26745.
95. Schneider GF, Dekker C. DNA sequencing with nanopores. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 326–8.
96. Descamps D, Assoumou L, Chaix M-L, *et al.* National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-2011. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2626–31.
97. Pou C, Noguera-Julian M, Pérez-Álvarez S, *et al.* Improved prediction of salvage antiretroviral therapy outcomes using ultrasensitive HIV-1 drug resistance testing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014; **59**: 578–88.
98. Mulder LCF, Harari A, Simon V. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 5501–6.
99. Paredes R, Sagar M, Marconi VC, *et al.* In vivo fitness cost of the M184V mutation in multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of lamivudine. *J Virol* 2009; **83**: 2038–43.
100. Brenner BG, Routy J-P, Petrella M, *et al.* Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 2002; **76**: 1753–61.

ANNEXES

Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing

Eve Todesco^{1-3*}, Christophe Rodriguez^{4,5}, Laurence Morand-Joubert^{1,2,6}, Mélanie Mercier-Darty⁴, Nathalie Desire¹⁻³, Marc Wirden¹⁻³, Pierre-Marie Girard^{1,2,7}, Christine Katlama^{1,2,8}, Vincent Calvez¹⁻³ and Anne-Geneviève Marcelin¹⁻³

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR S_1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; ²INSERM, UMR S_1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; ³Department of Virology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP Paris, France; ⁴Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France; ⁵INSERM U955, Créteil, France; ⁶Department of Virology, Hôpital Saint Antoine, AP-HP Paris, France; ⁷Department of Infectious Diseases, Hôpital Saint Antoine, AP-HP Paris, France; ⁸Department of Infectious Diseases, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP Paris, France

*Corresponding author. Department of Virology, Bât. CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33-1-42177401; Fax: +33-1-42177411; E-mail: eve.todesco@psl.aphp.fr

Received 25 September 2014; returned 5 November 2014; revised 3 December 2014; accepted 12 December 2014

Objectives: Resistant minority variants present before ART can be a source of virological failure. This has been shown for NRTIs, NNRTIs and CCR5 inhibitors. However, very few data are available for the detection of such minority resistant variants that could be selected at virological failure and not detected using classical Sanger sequencing.

Methods: We studied 26 patients treated with tenofovir, emtricitabine and efavirenz with their first virological failure (defined as two consecutive viral loads ≥ 50 copies/mL). We performed standard Sanger sequencing and ultradeep sequencing (UDS; Roche 454[™] Life Sciences) in plasma at failure. For UDS, mutations $\geq 1\%$ were considered. We compared the presence of reverse transcriptase mutations between the two techniques, using the latest ANRS algorithm.

Results: UDS detected more resistance mutations in 38.5% of cases (10/26 patients) and the genotypic sensitivity score (GSS) was reduced for 6 of them (23.1%). The GSS was impacted more often for NRTIs than for NNRTIs, for which most mutations were already detected by Sanger sequencing. Resistant minority variants were detected even in patients with low viral load at failure.

Conclusions: These results strongly argue for the use of next-generation sequencing in patients failing on an NRTI+NNRTI regimen, as UDS has the potential to modify the choice of the subsequent regimen.

Keywords: HIV-1 drug resistance, minority variants, virological failure, resistance genotyping

Introduction

The sequencing techniques currently used in routine work only detect viral populations if they account for $\geq 15\%$ – 20% of the total viral population.¹ However, minority resistant variants (MRVs), whose rates by definition are under the detection threshold of Sanger sequencing, seem to be important. Indeed, it has been shown that the presence of HIV-1 drug-resistant minority variants may increase the risk of virological failure in first-line treatment.² This was particularly demonstrated for NNRTI-based regimens.^{3–5} It was also shown that the existence of a minority subpopulation using the CXCR4 co-receptor at baseline was a risk factor for virological failure during CCR5 inhibitor treatment.^{6,7} The next-generation sequencing (NGS) technologies detect and quantify these MRVs at a far lower frequency. However, very few data are available for the detection of such MRVs that

could be selected at virological failure and most of the data were obtained in patients experiencing virological failure many times or during intermittent ART.^{8,9} The objective of the study was to evaluate the selection of MRVs and the underestimation of resistance mutations detected by current sequencing in patients with their first virological failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen.

Methods

Patients

Blood plasma from 26 patients treated with tenofovir, emtricitabine and efavirenz who had experienced their first virological failure (defined as two consecutive viral loads ≥ 50 copies/mL) were studied. All of them achieved a viral load < 50 copies/mL before failure. These patients could

have been treated previously (but without having any virological failure before). Patients were followed by the Department of Infectious Disease of Pitié-Salpêtrière and Saint Antoine Hospitals (Paris, France). Antiretroviral histories were obtained from the existing electronic database and/or medical record. We performed standard Sanger sequencing and ultradeep sequencing (UDS; Roche 454[™] Life Sciences) in the sample corresponding to the second detectable viral load ≥ 50 copies/mL. All patients were still under therapy at the time of genotypic resistance testing, meaning that the virus was still under drug selection pressure and that resistance mutations could be detected if they existed.

Sanger sequencing

The sample corresponding to the second detectable plasma HIV-1 RNA ≥ 50 copies/mL was used for genotypic testing. Reverse transcriptase (RT) resistance genotypic analysis was conducted according to the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) consensus method.¹⁰ Any sequences found to have a mixture of wild-type and mutant amino acid residues at single positions were considered to have the mutant at that position. Resistance was interpreted according to the latest version of the ANRS algorithm (www.hivfrenchresistance.org). Subtype determination was performed using the HIV module of SmartGene (SmartGene, Zug, Switzerland), the methodology of which is based on BLAST. The database of the HIV module is composed of sequences of different subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) published by Los Alamos on <http://www.hiv.lanl.gov>. In the case of inconclusive results, the HIV SmartGene module provides the ability to perform a phylogenetic analysis.

UDS

After RNA extraction (NucliSENS[™] Easy MAG[™], bioMérieux Clinical Diagnostics), reverse transcription into DNA was done using RT enzyme and DNA was then amplified by PCR (Titan One Tube RT-PCR Kit[™], Roche Applied Science) using specific primers for the RT gene.¹¹ A nested PCR was performed with a high-fidelity Taq polymerase (Q5[™] High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs), each primer consisting of an adapter, a 'key' of four nucleotides, a specific patient sequence (identifier of 10 nucleotides) and the target sequence. PCR products were purified with AMPure[™] Beads (Agencourt, Biosciences), quantified using a Qubit[™] 2.0 Fluorometer (Life Technologies) and pooled equimolarly. Pyrosequencing on GS Junior (Roche 454[™] Life Sciences) was performed according to the manufacturer's recommendations.¹² RT sequencing by UDS was performed on two fragments: RT1 (RT amino acids 17–140) and fragment RT2 (RT amino acids 133–247). Amplicon Variant Analyser (AVA) was used to analyse the UDS results.

The presence of RT mutations was compared between the two sequencing methods. For UDS, mutations with a frequency of $\geq 1\%$ were considered. Resistance mutations were interpreted using the latest ANRS algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org>). The genotypic susceptibility score (GSS) was calculated (drug with full susceptibility, 1; intermediate resistance, 0.5; full resistance, 0) with and without taking account of MRVs.

Statistical analysis

Patients were separated into two groups: with and without additional mutations detected by UDS. Fisher's exact test and the Mann-Whitney test were used to compare baseline characteristics of patients for categorical (subtype B, previous treatment) and continuous (viral load, CD4 cells count, time before failure) variables, respectively, between the groups. In univariate analysis, subtype (B/non-B), previous treatment (yes/no), viral load, CD4 cell count and time under the tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen before failure were investigated as potential factors relevant to the occurrence of MRVs. All factors with $P < 0.2$ were retained for multivariate analysis and a logistic regression model was used to investigate whether previous variables were independent predictors of the occurrence of MRVs.

Results

UDS coverage

A median of 4790 and 6455 reads per nucleotide position was amplified for RT1 and RT2, respectively, which allowed accurate detection of variants down to a frequency of 1%.^{12,13} The average error rate in controls (cellular clone 8E5) was 0.0038.

Patients

A large proportion of patients were infected with HIV-1 subtype B (12/26). One patient was infected with a subtype G virus, one with a subtype A virus and 12 with CRFs (6 CRF02, 2 CRF01, 1 CRF09, 1 CRF14, 1 CRF06 and 1 CRF11). Viral load at failure ranged from 156 to 118553 copies/mL [2.2 to 5.1 log; median \pm 1228 copies/mL (3.1 log)], with 13 patients having a viral load ≥ 1000 copies/mL. The median CD4 cell count was 369 cells/mm³ (range 60–1134 cells/mm³). The median time under tenofovir, emtricitabine and efavirenz treatment before failure was 11 months (range 1–61 months). None of the patients had previous virological failure, even though some of them had received another treatment before the tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen.

Sequencing

Six patients did not harbour any resistance mutation detected by either bulk sequencing or UDS. Among these six patients, only one had received treatment previously. Ten patients had exactly the same mutations detected by both methods; four of them were previously treated.

Finally, 10 patients (38.5%) had more mutations detected by UDS than by bulk sequencing. Eight of these 10 patients had received one or more lines of treatment before the tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen. Characteristics of these patients are described in the following paragraphs and Table 1.

UDS detected MRVs affecting NRTI resistance in viruses from seven patients (eight MRVs). The M41L mutation was identified in viruses from three patients who had received NRTIs before. The M184V mutation was detected in virus from one patient who had previously been treated with emtricitabine. However, the K65R mutation was present in two patients never treated with tenofovir before the start of the tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen. In addition, one L74I and one K219Q mutation were also detected. The NRTI GSS was decreased for five of the seven patients.

Additional NNRTI mutations were found in the plasma of five patients (five MRVs). The V179I mutation was identified in viruses from two patients who had received efavirenz before. The Y188H, H221Y and M230V mutations were each detected in single patients who had never been treated with NNRTIs. The NNRTI GSS was reduced in two of the five patients (in these two patients rilpivirine susceptibility was affected by the additional mutations H221Y or M230V).

Finally, in 6 of the 10 patients who had more mutations detected by UDS, the GSS calculated by UDS was reduced (by up to 3.5) compared with the GSS calculated using Sanger sequencing results.

Of note, MRV were detected even in patients with low viral load at failure (six cases of patients with viral load ≥ 1000 copies/mL).

To complete this work, we searched for genotypes before the start of tenofovir, emtricitabine and efavirenz treatment. We

Table 1. Characteristics of patients who had more mutations detected by UDS

Patient	Viral load (copies/mL)	Previous drugs ^a	Time under TDF/FTC/EFV (months)	Mutations detected by both Sanger sequencing and UDS ^a	Drug resistance detected both by Sanger sequencing and UDS ^{a,b}	Mutations detected by UDS only (coverage of the mutation: number of reads)		Drug resistance detected by UDS only ^{a,b}	Reduction of GSS ^c
						%	mutational load copies/mL		
1	248	TDF FTC EFV	42	—	—	V179I (3241)	14	no	0
2	612	3TC ddI d4T NVP EFV	10	—	NVP EFV	5.56	M41L (6840)	no	0
3	156	no	22	K103N V179I K70R M184V K103N	NVP EFV 3TC/FTC NVP EFV	5.03	K65R (6924)	TDF ABC d4T ddI	3.5
4	11891	no	12	—	—	8.86	Y188H (6268)	—	0
5	14267	ZDV ABC 3TC EFV	12	K101E K103N K65R M184V A98S L100I K103N E138A	NVP EFV RPV 3TC/FTC TDF NVP EFV RPV ETR	3.95	M41L (2796)	no	0
6	2108	3TC —	1.5	M184V K103N P225H	3TC/FTC NVP EFV	2.28	V179M (3386)		
7	909	d4T TDF 3TC/FTC —	11.5	M41L M184V T215Y K103N	ZDV d4T 3TC/FTC NVP EFV	5.28	L74I (4096)	ABC ddI RPV	3
8	9860	ZDV ABC 3TC/FTC EFV	12	M184I K103N Y188H	3TC/FTC NVP EFV	16.96	H221Y (3945)	—	1
9	336	ZDV d4T 3TC NVP	13	M184V T215Y A98G K101Q K103N G190A	ZDV d4T 3TC/FTC NVP EFV	4.83	M230V (3296)	—	3.5
10	296	TDF FTC —	10	no	no	2.50	K65R (4602)	TDF ABC d4T ddI	3.5
						5.95	M41L (6500)	ABC	0.5
						12.28	M184V (15372)	3TC/FTC	1
						3.02	K219Q (15349)	—	

3TC, lamivudine; ABC, abacavir; d4T, stavudine; ddI, didanosine; EFV, efavirenz; ETR, etravirine; FTC, emtricitabine; NVP, nevirapine; RPV, rilpivirine; TDF, tenofovir; ZDV, zidovudine.

^aNRTIs are listed on the first line and NNRTIs on the second.

^bDrug with intermediate resistance in bold.

^cReduction of Sanger GSS by the presence of MRVs (1, drug with full susceptibility; 0.5, intermediate resistance; 0, full resistance).

found only 4/10 available Sanger genotype results in the treatment-naïve status (Table 1; patients 3, 4, 6 and 8). Only a K103T mutation was found (patient 8). However, unfortunately, no samples were available so we could not perform UDS.

Statistical analysis

In univariate analysis, the presence of MRVs detected only by UDS was associated with a longer time under tenofovir, emtricitabine and efavirenz before failure ($P=0.0585$) and, non-significantly, with previous treatment ($P=0.0992$). In multivariate analysis, there was only a non-significant relationship between the presence of MRVs detected only by UDS and prior treatment ($P=0.097$).

Discussion

In patients failing a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen, the use of UDS instead of classical Sanger sequencing on plasma samples at failure detected more resistance mutations to ART in 38.5% (10/26 patients) of cases and, more relevantly, the GSS was reduced in 23.1% (6/26 patients) of cases, with a potential impact on salvage treatment.

Overall, total concordance was found between Sanger sequencing and UDS for all mutations detected by bulk sequencing. Additional mutations were found in approximately half of the samples in which resistance mutations were detected by Sanger sequencing (10/19 patients). It seems that patients who were more likely to have MRVs were previously treated patients and those who were treated for a longer time with tenofovir, emtricitabine and efavirenz.

When the presence of MRVs impacted the GSS, it was more often for NRTIs than for NNRTIs. This was presumably because NNRTIs, which are drugs with a low genetic barrier, were already widely affected by the mutations found by Sanger sequencing (K103N was already detected by Sanger sequencing in 9 of 10 viruses with additional mutations in UDS). Thus, our study emphasizes the interest of UDS for NRTI resistance at first failure, whereas the interest of UDS was previously highlighted for NNRTI resistance in first-line treatments.^{3,4} We detected MRVs in 6 of 13 patients with a viral load > 1000 copies/mL, but it is generally accepted that the value of UDS is questionable for such low viral loads because of the stochastic distribution of low-copy-number samples, and therefore viral loads > 1000 copies/mL had not been studied by UDS previously.¹⁴ However, despite a certain variability in detecting MRVs, it seems interesting to study the low viral loads, especially since it has been shown that, even with a small number of mutated copies/mL, some variants of resistance could be correlated with virological failure.³ Obviously, further studies are needed to follow prospectively the impact of these MRVs on the virological response to subsequent regimens. However, these results reinforce recently published data and could argue in favour of the use of UDS in patients failing on an NRTI + NNRTI regimen,¹⁵ even in patients with a viral load at failure > 1000 copies/mL.

Acknowledgements

We thank Géraldine Lemallier and Philippe Grange for their technical assistance.

Presented in part at the International Workshop on Antiviral Drug Resistance, Germany, Berlin, 2014 (Abstract 79).

Funding

This work received financial support from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)' (grant agreement no. 223131) and Roche Diagnostics France.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Larder BA, Kohli A, Kellam PE et al. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature* 1993; 365: 671–3.
- Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH et al. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 2009; 199: 693–701.
- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ et al. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011; 305: 1327–35.
- Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F et al. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2014; doi:10.1093/jac/dku426.
- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ et al. Impact of minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations on resistance genotype after virologic failure. *J Infect Dis* 2013; 207: 893–7.
- Swenson LC, Mo T, Dong WWY et al. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 2011; 203: 237–45.
- Moore JP, Kuritzkes DR. A piece de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4: 118–24.
- Le T, Chiarella J, Simen BB et al. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One* 2009; 4: e6079.
- Delobel P, Saliou A, Nicot F et al. Minor HIV-1 variants with the K103N resistance mutation during intermittent efavirenz-containing antiretroviral therapy and virological failure. *PLoS One* 2011; 6: e21655.
- Descamps D, Delaugerre C, Masquelier B et al. Repeated HIV-1 resistance genotyping external quality assessments improve virology laboratory performance. *J Med Virol* 2006; 78: 153–60.
- Jung M, Agut H, Candotti D et al. Susceptibility of HIV-1 isolates to zidovudine: correlation between widely applicable culture test and PCR analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5: 359–64.
- Daigle D, Simen BB, Pochart P. High-throughput sequencing of PCR products tagged with universal primers using 454 life sciences systems. *Curr Protoc Mol Biol* 2011; Suppl 96, Chapter 7: Unit 7.5.1-7.5.14.
- Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B et al. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007; 17: 1195–201.
- Stenman J, Lintula S, Rissanen O et al. Quantitative detection of low-copy-number mRNAs differing at single nucleotide positions. *BioTechniques* 2003; 34: 172–7.
- Pou C, Noguera-Julian M, Pérez-Álvarez S et al. Improved prediction of salvage antiretroviral therapy outcomes using ultrasensitive HIV-1 drug resistance testing. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 578–88.

Presence of Minority Resistant Variants after Failure to Tenofovir, Emtricitabine and Rilpivirine Regimen

Eve Todesco PharmD^{*‡}, Laure Surgers MD^{§||}, Anne-Geneviève Marcelin PharmD PhD^{*‡}, Vincent Calvez MD PhD^{*‡}, Jean-Luc Meynard MD PhD[§], Laurence Morand-Joubert MD PhD^{*†}

Institutional affiliations:

* Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), F75013, Paris, France

† Department of Virology, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France

‡ Department of Virology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France

§ Department of Infectious Diseases, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France

|| Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06 CR7, Paris, France; INSERM U1135, CIMI, Team E13

Running head: Rilpivirine and Minority Resistant Variants

Corresponding author:

Eve Todesco, Department of Virology, Bât CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Email: eve.todesco@aphp.fr

Conflicts of Interest and Source of Funding:

This work has received the financial support of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). All authors: no conflict.

Key words: High-Throughput Nucleotide Sequencing; Deep Sequencing; Drug Resistance; minority resistant HIV-1 variants; Virological failure; Rilpivirine

To the Editors:

INTRODUCTION

The routine sequencing techniques only detect viral populations if they account for more than 15-20% of viral population. However, presence of HIV-1 minority resistant variants (MRV), whose rates are under the detection threshold of Sanger sequencing, appears to have an impact more or less important according to molecules used. This impact has been mainly shown for Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) in first-line treatment.^{1,2} MRV can be detected and quantified by UltraDeep Sequencing (UDS) at a far lower frequency. However, the detection of such MRV that could be selected at virological failure has not been deeply studied.³⁻⁵

This work complements the prospective study already published in the same journal which followed 155 patients with plasma HIV-RNA <20 copies/mL at baseline and switched to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine from september 2012 to May 2013 at Saint-Antoine Hospital (Paris, France).⁶ Indeed, rilpivirine is a recent NNRTI widely used but few data are available for this drug in real life.

Here, we studied virological failure to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine of the previous study by UDS in order to evaluate the selection of MRV and the impact on following treatments.

METHODS

From September 2012 to May 2013, all patients with Viral Load (VL) HIV-RNA <20 copies/mL and switching to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine were included in a prospective study at Saint-Antoine Hospital (Paris, France). Sanger sequencing was

performed before baseline in plasma and Sanger and UltraDeep Sequencing (UDS, Roche 454[®] Life Sciences) were performed in patients with two consecutive VL >20 copies/mL).

Sanger sequencing. Reverse transcriptase resistance genotypic analysis was conducted according to the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) consensus method. Any sequences found to have a mixture of wild type and mutant amino acid residues at single positions were considered to have the mutant at that position.

UltraDeep Sequencing. After RNA extraction (NucliSENS[®] Easy MAGTM, bioMérieux Clinical Diagnostic, Marcy-l'Étoile, France), a Reverse Transcription (RT) into DNA was done using a Reverse Transcriptase (RT) and DNA was then amplified by a PCR (Titan One Tube RT-PCR Kit[®], Roche Applied Science, Branford, CT, United States) using specific primers of Reverse Transcriptase gene. A nested PCR was made with a high-fidelity Taq polymerase (Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA, United States) in which each primer consisted of an adapter, a "key" of 4 nucleotides, a specific patient sequence (identifier of 10 nucleotides) and the target sequence. PCR products were purified by AMPure[®] Beads (Agencourt, Beckman Coulter, Fullerton, Californie, CA, United States), quantified using Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Waltham, MA, USA) and pooled equimolarly. Pyrosequencing on GS Junior (Roche 454[®] Life Sciences, Branford, CT, United States) was performed according to manufacturer recommendations.⁷ RT sequencing by UltraDeep Sequencing (UDS) was performed in 2 fragments: first fragment RT1 (RT amino acid 17-140), second fragment RT2 (RT amino acid 133-247). GS Amplicon Variant Analyser (AVA) was used to analyse the UDS results.

The presence of RT mutations was compared between both sequencing techniques. For UDS, mutations >1% were considered. Resistance mutations were interpreted using the last ANRS algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

RESULTS

UDS coverage. A median of 5015 reads per Nucleotide position was amplified, which allowed for accurate detection of variants down to 1%.^{7,8} The average error rate in controls (cellular clone 8E5) was 0.0018.

One-hundred-fifty-five patients were included. Of the 118 patients with genotype before baseline, resistance was observed to the following molecules: tenofovir/emtricitabine/rilpivirine (n=1), tenofovir/emtricitabine (n=3), emtricitabine (n=4), and efavirenz/nevirapine (n=6; three isolated K103N and two K103N associated with M184I/V, one G190A).⁶ Four patients had a VL > 20 copies/mL three months after the switch to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine (4/155; data shown Table 1). In all these patients, a mutation conferring resistance to nevirapine/efavirenz was found before baseline [K103N for 3 of them (patients 1, 3 and 4); one G190A (patient 2)]. Among the three patients harboring the K103N mutation, two of them also carried the M184I/V (conferring resistance to emtricitabine, patient 1 and 3), with several NRTI-mutations. At failure, one of these 2 patients developed the Y181C (9.8%) mutation in plasma, detected by UDS only (conferring additional resistance to rilpivirine; patient 3). There was no sample for the second one at failure. The remaining patient (patient 4) was not considered as having a virological failure in the prospective study because of a detectable viral load but <50 copies/mL (44 copies/mL). He harbored a K103N mutation

without M184V at baseline and two additional MRV were detected by UDS at failure in PBMC (plasma RNA not amplified): M184I (1.2%, conferring resistance to emtricitabine) and M230I (2.0%, conferring resistance to rilpivirine).

DISCUSSION

Few patients were experiencing virological rebound after the switch to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine (2.6%, n=4) and in all cases, rapidly (three month after the switch).

Furthermore, in patients experiencing virological rebound, UDS brings us additional key pieces of information. Indeed, we found MRV in 2 of the 3 patients, among them the Y181C mutation with a significant mutational load conferring resistance to rilpivirine (247 copies/mL; patient 3).

Interestingly enough, both K103N and M184V mutations had been detected years before failing this regimen in two of the patients experiencing failure. Moreover, the M184I mutation developed in patient 4 at virological rebound (PBMC) also added to a K103N mutation present at baseline in plasma. Whereas the M184V has a well-known impact on emtricitabine,^{9,10} isolated K103N has not been shown to be associated with rilpivirine resistance. Nevertheless, on HAART already weakened, it is possible that it facilitates the risk of virological failure with emergence of minority resistant variants to rilpivirine (Y181C, M230I).

Obviously, the number of virological failure or rebound is low in this study and further studies are needed to follow the impact of these MRV on the virological response to tenofovir, emtricitabine and rilpivirine and subsequent regimen. Furthermore, we have

not studied the fitness of the virus in PBMCs of the patient 4. Indeed, the mutations detected (M184I, M230I) were G>A mutations and are certainly the result of APOBEC editing. It is known that APOBEC facilitates emergence of some antiretroviral resistance mutations and can also leads to defective virus.^{11,12} Indeed, 69% and 97% of sequences harboring the M184I and the M230I mutations also carried at least one stop codon, respectively (Tryptophan UGG changed to a stop codon UAG, UAA or UGA). It is difficult to know if the remaining viral sequences can replicate but if it is the case, then the virus harbors mutations of resistance to emtricitabine and rilpivirine. In fact, it has been shown that APOBEC can act at a sublethal level¹³ and it may also have recombination events leading to a non-defective resistant virus harboring APOBEC mutations.¹⁴

Thus, UDS is a powerful technique which allows detection of MRV possibly involved in virological failure or rebound and which could have an impact on subsequent regimen.

REFERENCES

1. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, *et al.*, CHAIN Minority HIV-1 Variants Working Group. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 930–40.
2. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, *et al.* Low-frequency hiv-1 drug resistance mutations and risk of nnrti-based antiretroviral treatment failure: A systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011; **305**: 1327–35.

3. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, *et al.* Impact of minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations on resistance genotype after virologic failure. *J Infect Dis* 2013; **207**: 893–7.
4. Todesco E, Rodriguez C, Morand-Joubert L, *et al.* Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1503–6.
5. Vandenhende M-A, Bellecave P, Recordon-Pinson P, *et al.*, others. Prevalence and Evolution of Low Frequency HIV Drug Resistance Mutations Detected by Ultra Deep Sequencing in Patients Experiencing First Line Antiretroviral Therapy Failure. *PloS One* 2014; **9**: e86771.
6. Surgers L, Valin N, Viala C, *et al.* Evaluation of the efficacy and safety of switching to tenofovir, emtricitabine, and rilpivirine in treatment-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2015; **68**: e10–2.
7. Daigle D, Simen BB, Pochart P. High-throughput sequencing of PCR products tagged with universal primers using 454 life sciences systems. *Curr Protoc Mol Biol Ed Frederick M Ausubel Al* 2011; **Chapter 7**: Unit7.5.
8. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, *et al.* Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007; **17**: 1195–201.
9. Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, *et al.* Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 5653–6.

10. Maserati R, De Silvestri A, Uglietti A, *et al.*, ARCA Collaborative Group. Emerging mutations at virological failure of HAART combinations containing tenofovir and lamivudine or emtricitabine. *AIDS Lond Engl* 2010; **24**: 1013–8.
11. Fourati S, Malet I, Binka M, *et al.* Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *AIDS Lond Engl* 2010; **24**: 2313–21.
12. Fourati S, Lambert-Niclot S, Soulie C, *et al.* HIV-1 genome is often defective in PBMCs and rectal tissues after long-term HAART as a result of APOBEC3 editing and correlates with the size of reservoirs. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2323–6.
13. Kim E-Y, Bhattacharya T, Kunstman K, *et al.* Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J Virol* 2010; **84**: 10402–5.
14. Mulder LCF, Harari A, Simon V. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 5501–6.

1 **UltraDeep Sequencing Interest in the Study of Transmitted Drug Resistance**
2 **among Men having Sex with Men and Heterosexual Populations** (original
3 article)

4 **Short title: Transmitted Drug Resistance Detection**

5 Eve TODESCO ^{1, 2 *}, Charlotte CHARPENTIER ^{3, 4, 5}, Mélanie BERTINE ^{3, 4, 5}, Marc Wirden ^{1, 2},
6 Alexandre STORTO ⁵, Nathalie DESIRE ¹, Maxime GRUDE ¹, Sophie SAYON ^{1, 2}, Yazdan
7 YAZDANPANAH ^{3, 4, 6}, Christine KATLAMA ^{1, 7}, Diane DESCAMPS ^{3, 4, 5}, Vincent CALVEZ ^{1, 2}, Anne-
8 Geneviève MARCELIN ^{1,2}

9 ¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de
10 Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), F75013, Paris, France

11 ² Department of Virology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F75013, Paris, France

12 ³ INSERM, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France

13 ⁴ Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France

14 ⁵ AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Virologie, F-75018, Paris, France

15 ⁶ AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Department of Infectious Diseases, F-75018 Paris, France

16 ⁷ Department of Infectious Diseases, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F75013, Paris, France

17

18 **Word counts of the abstract: 206 words**

19 **Word counts of the text: 1781 words**

20

21 **Keywords:** HIV Infection; High-Throughput Nucleotide Sequencing; Deep Sequencing;

22 Drug Resistance; minority resistant HIV-1 variants; Transmitted HIV-1 Drug Resistance.

23 **Corresponding author:**

24 Eve Todesco, Department of Virology, Bât CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris,
25 France. Email: eve.todesco@aphp.fr

26 **SYNOPSIS**

27 **Objectives**

28 Transmitted Drug Resistance (TDR) detection can impair first-line antiretroviral therapy response.
29 It has been recently shown by Sanger sequencing that TDR was more common among Men having
30 Sex with Men (MSM) in the 2010/2011 French survey study. We aimed to study the interest of
31 UltraDeep Sequencing (UDS) in the surveillance of TDR.

32 **Methods**

33 We compared the presence of resistance mutations, both in majority (>20%) and in minority (1-
34 20%) proportions, between two groups of HIV transmission: 70 treatment-naive MSM and 70
35 treatment-naive heterosexual population recently screened positive for HIV-1. We performed
36 standard Sanger Sequencing and UDS. The virological outcome was checked in medical records.

37 **Results**

38 Between the 2 groups, global prevalence of TDR was not significantly different either by Sanger or
39 by UDS. Nevertheless, a higher frequency of NRTI-TDR was observed among heterosexual patients
40 than in MSM ($p=0.04$). There was also a trend for a higher frequency of TDR in MSM infected with
41 B subtype compared to MSM non-B subtype ($p=0.06$). Relation between minority TDR mutation
42 and virological failure remained unclear as few antiretroviral regimens were impacted by the
43 mutations found by UDS.

44 **Conclusions**

45 These results demonstrate the interest of UDS for the surveillance of HIV-1-TDR, with a potential
46 impact on the choice of first-line treatment.

47

48 INTRODUCTION

49 Transmitted Drug Resistance (TDR) detection can impair first-line antiretroviral
50 therapy response. Indeed, the presence of TDR-mutations can conduct to a higher risk of
51 virological failure to the affected drugs if they are introduced. ¹ The surveillance of HIV
52 type 1 (HIV-1) TDR is widely recommended and it has been shown that TDR was more
53 common among Men having Sex with Men (MSM) and B subtype infected patients in the
54 2010/2011 French survey study conducted in antiretroviral-naïve chronically HIV-1-
55 infected population by standard sequencing techniques currently used. ² Standard
56 sequencing techniques detect viral populations accounting for more than 15-20% of viral
57 population. However, HIV-1 minority resistant variants, whose rates are <15-20%, can be
58 a source of virological failure if they are present before antiretroviral treatment: it was
59 mainly shown for NNRTIs first line based regimens. ^{3,4} The detection of minority
60 population using the CXCR4 coreceptor before CCR5 inhibitors-based treatment can also
61 be a risk factor for virological failure. ⁵ The next generation sequencing technologies are
62 able to detect these minority variants. Nevertheless, despite the increased use of
63 UltraDeep Sequencing (UDS), few data are available on presence of minority TDR variants
64 in different groups of HIV transmission, treatment-naive patients. ^{6,7}
65 The aim of the study was to compare the presence of TDR mutations, both in majority
66 (>20%) and in minority (1-20%) proportions, between treatment-naive MSM and
67 treatment-naive heterosexual HIV-1 chronically infected patients.

68 PATIENTS AND METHODS

69 *Patients.* The study enrolled 70 treatment-naïve MSM and 70 treatment-naïve
70 heterosexual patients recently diagnosed for HIV-1. The group of heterosexual patients
71 was exclusively composed by patients from sub-Saharan Africa origin. We performed

72 standard Sanger Sequencing (n=140; Reverse Transcriptase gene (RT) and Protease gene
73 (PR)) and UltraDeep Sequencing (n=70 RT and n=70 PR sequences among MSM group;
74 n=54 RT and n=67 PR sequences among heterosexual group). Patients were followed by
75 Department of Infectious Diseases of Pitié-Salpêtrière and Bichat Claude Bernard
76 hospitals (Paris, France). Antiretroviral histories were obtained from the existing
77 electronic database and/or medical record. Patients were informed that their
78 demographic and clinical data will be recorded during their follow up and could be used
79 for retrospective studies and gave their consent. This study was approved by the ANRS
80 AC11 Ethics Committee.

81 *Sanger sequencing.* The sample of plasma at time of HIV infection diagnosis was used for
82 performing genotypic resistance test. RT and PR genotypic analysis was conducted
83 according to the ANRS consensus method.⁸ PR and RT mutations were identified using
84 the consensus statement of the list for the TDR genotypic surveillance.⁹ Any sequences
85 found to have a mixture of wild type and mutant amino acid residues at single positions
86 were considered to have the mutant at that position.

87 The subtype determination was performed using the Module HIV of SmartGene
88 (SmartGene, Zug, Switzerland) whose methodology is based on BLAST. The database is
89 made (and synchronized) with subtypes and CRF's, such as annotated and published by
90 Los Alamos on <http://www.hiv.lanl.gov>. In case of inconclusive results, the HIV
91 SmartGene module provides the ability to perform a phylogenetic analysis.

92 *UDS.* The steps until pyrosequencing on GS Junior (Roche 454[®] Life Sciences, Branford, CT,
93 United States) were previously described.¹⁰ Pyrosequencing was performed according to
94 manufacturer recommendations.¹¹ GS Amplicon Variant Analyzer was used to analyze
95 the UDS results. Alignments were checked.

96 The presence of PR and RT mutations was compared between both sequencing
97 techniques and between the two populations of patients.

98 *Statistical Analysis.* Chi 2 and Mann-Whitney tests were used to compare baseline
99 characteristics for categorical (subtype) and continuous variables (age, viral load, CD4
100 cells count) between the MSM and heterosexual populations, respectively.

101 Global prevalence and prevalence of TDR mutations by antiretroviral classes were
102 compared by a Chi 2 test between the two groups.

103 **RESULTS**

104 An average of 5198 reads per nucleotide position was amplified and the average error
105 rates in controls (cellular clone 8E5) were 0.0012 and 0.0032 for RT and PR, respectively.

106 These results allowed for accurate detection of variants down to 1%. [10, 11]

107 Characteristics of patients are as follows: the median age was 36.3 years among the 70
108 MSM patients and 35.4 years among the 70 heterosexual patients (60% female), without
109 significant difference between the two populations. Sixty percent of the viruses were B
110 subtype in MSM group whereas 94% were non-B in the heterosexual group. Among the
111 MSM patients, median viral load (VL) was 4.9 log₁₀ copies/mL (IQR=4.4-5.4) and median
112 CD4 cell count was 498/mm³ (IQR=347-585). Among the heterosexual patients, median
113 VL was 4.9 log₁₀ copies/mm³ (IQR=4.3-5.3) and median CD4 cell count was 348/mm³
114 (IQR=208-497). The levels of HIV-1 viral load were similar between the two groups, but
115 median CD4 cell count was higher among MSM than in heterosexual patients (p= 0.0016).

116 Global prevalence of TDR and prevalence by drug classes are presented in Table 1.

117 Sanger sequencing detected NRTIs-TDR in viruses of one MSM patient (M41L, T215C) and
118 three heterosexual patients (M41L, T215E, M184I/V); NNRTI-TDR was detected in viruses

119 of two MSM patients (K103N) and three heterosexual patients (K103N, Y181I, Y188L) and
120 PIs-TDR was detected in virus of one heterosexual patient (I85V).

121 Within each group, we retrieved a higher prevalence of TDR mutations when UDS was
122 performed: prevalence of PR or RT-TDR was 18.6% (95%CI=9.4%-27.7%) with UDS *versus*
123 4.3% (95%CI=0.0%-9.1%) with Sanger Sequencing among MSM and 22.8% (95%CI=12.7%-
124 33.0%) with UDS *versus* 7.1% (95%CI=0.9%-13.4%) with Sanger Sequencing among
125 heterosexual population.

126 Among the MSM, the increased TDR with UDS was observed especially for NNRTI and PI
127 (10.0% *versus* 2.9% by Sanger sequencing and 7.1% *versus* 0.0% by Sanger sequencing,
128 respectively) while it was mainly for NRTI and PI among the heterosexual patients (14.8%
129 *versus* 4.3% by Sanger sequencing and 10.4% *versus* 1.4% by Sanger sequencing,
130 respectively).

131 The rate of TDR mutations only detected by UDS was low: between 1.1% and 4.8% for
132 NRTI, 1.1% and 1.5% for NNRTI and 1.1% and 7.0% for PI (Figure 1).

133 Between the 2 groups, global prevalence of TDR was not significantly different either by
134 Sanger or by UDS. Nevertheless, a higher frequency of NRTI-TDR was observed among
135 heterosexual patients than in MSM (14.8% *versus* 4.3%, respectively; $p=0.04$).

136 We also retrieved a trend for a higher frequency of TDR in MSM patients infected with B
137 subtype compared to MSM patients infected with non-B subtype (26.2% (n=11/42) *versus*
138 7.1% (n=2/28) with UDS ($p=0.06$), data not shown).

139 In addition, some resistance mutations, not considered in the list for TDR genotypic
140 surveillance, but considered as major in some genotypic algorithms, were identified as
141 minority variants. For instance, three K65E mutations in patients who received a

142 tenofovir-based regimen and an E138A mutation in a patient who received a rilpivirine-
143 based regimen were detected by UDS.

144 Then, the virological outcome of patients who initiated antiretroviral treatment has been
145 studied after 6 and 12 months of treatment. Among the 140 studied patients, 113
146 initiated an antiretroviral treatment and were followed (63 MSM and 50 heterosexual
147 patients). Eight of them harbored a virological failure, defined by a VL >50 copies/mL at 6
148 or/and 12months, and one a slow VL decrease (>50 copies/mL at 6 months and <50
149 copies/mL at 12 months). None of these patients had resistance mutation at baseline by
150 Sanger sequencing but four had minority TDR mutations only detected by UDS. Among
151 these four patients, no impact on the first-line treatment was observed for three of them
152 [V75M (1.8%); G190E (1.5%); D30N (1.3%)]. The remaining patient had an Y181C mutation
153 (1.1%) which could have had an impact on the first line regimen
154 (tenofovir/emtricitabine/efavirenz/maraviroc): indeed, after a good VL decrease during
155 the first two months of treatment, the VL decreased very slowly between 3rd and 12th
156 months. Among patients who were in virological success, seven and 25 viruses harbored
157 mutations detected by Sanger and by UDS, respectively. Only one of them had a mutation
158 detected by UDS that could have had an impact on the first-line treatment (M184V
159 (4.8%); tenofovir/emtricitabine/atazanavir/ritonavir).

160 **DISCUSSION**

161 Higher prevalence of TDR was observed in antiretroviral-naive chronically HIV-1-infected
162 MSM and heterosexual populations when UDS was used compared to population
163 sequencing. Indeed, these powerful techniques could improve the detection of HIV-1-
164 TDR.

165 In the present study, UDS allowed to detect a higher frequency of NRTI-TDR in
166 heterosexual than in MSM patients. This result can be explained by several hypotheses, as
167 the group of heterosexual patients studied here is exclusively composed by patients from
168 sub-Saharan Africa origin. The first one is that a part of this naive-treatment heterosexual
169 population had been already exposed to NRTIs without reporting this fact or even without
170 knowing it. The second hypothesis is that patients coming from sub-Saharan Africa are
171 increasingly treated and therefore, it is conceivable that TDR is increasing in African origin
172 patients, with a potential impact on the first-line treatment choice. This should reinforce
173 the recommendations of TDR surveillance in resource limited settings where
174 antiretroviral coverage is increasing.

175 Otherwise, UDS evidenced among MSM a higher frequency of TDR in subtype B versus
176 subtype non B infected patients. That is consistent with what has been previously shown
177 by Sanger sequencing in the Odyssee study on antiretroviral-naive chronically HIV
178 infected patients and in the study on French patients diagnosed at the time of primary
179 HIV-1 infection ^{2,13}.

180 Moreover, it should be noted that the actual resistance transmission list does not contain
181 some mutations such as the E138A mutation that can be polymorphic, but also impacts
182 the efficiency of rilpivirine or such as the tenofovir resistance-associated mutation K65E
183 present in three viruses in this study. It could be useful to revise this TDR list as new
184 antiretrovirals are now available since it has been published.

185 Finally, the impact of minority TDR mutations is difficult to analyze in the present study
186 because few antiretroviral drugs were impacted by mutations found by UDS at baseline.
187 Moreover, about half of the patients who initiated antiretroviral drugs were treated with
188 boosted PI-based regimens, possibly hiding the impact of minority TDR mutations on low

189 genetic barrier therapeutic classes. We obviously need further investigations for NRTI,
190 second generation NNRTIs and PI-based regimen, as the impact of minority TDR
191 mutations on first generation NNRTIs is already well known.^{3,4} Furthermore, the impact
192 of minority TDR mutations on integrase strand transfer inhibitors has not been studied in
193 this work. The few data available on this subject are still controversial^{14,15}. Nevertheless,
194 an increase of TDR is predictable for this therapeutic class with the extensive use of these
195 drugs and should be monitored in the future.

196 In conclusion, UDS allows sensitive monitoring of TDR, and is able to evidence some
197 disparities of TDR between HIV groups of transmission. The impact of these minority TDR
198 mutations for certain therapeutic classes and in particular for the more recent drugs
199 should be further evaluated.

200

201 **Acknowledgments:**

202 We thank Géraldine Lemallier and Philippe Grange for their technical assistance.

203 **Source of Funding:**

204 This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), and by
205 ROCHE DIAGNOSTICS FRANCE.

206 **Transparency declarations:**

207 All authors: none to declare.

208 **Presented in part:**

209 Data were in part at the International Workshop on Antiviral Drug Resistance 2015 (February
210 2015, Seattle, WA, abstract 71) and at the 13th European workshop on HIV and Hepatitis (June
211 2015, Barcelone, Spain, abstract 24)

212

213 **References**

- 214 1. Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F, *et al.* Effect of transmitted drug resistance on virological
215 and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-
216 CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 363–71.
- 217 2. Descamps D, Assoumou L, Chaix M-L, *et al.* National sentinel surveillance of transmitted drug
218 resistance in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-
219 2011. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2626–31.
- 220 3. Li JZ, Paredes R, Ribaldo HJ, *et al.* Low-frequency hiv-1 drug resistance mutations and risk of
221 nrti-based antiretroviral treatment failure: A systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011;
222 **305**: 1327–35.
- 223 4. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Giallonardo FD, *et al.* Low-frequency drug-resistant HIV-1 and
224 risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case–control study
225 using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 930–40.
- 226 5. Swenson LC, Mo T, Dong WWY, *et al.* Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage:
227 application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis*
228 2011; **203**: 237–45.
- 229 6. Cunningham E, Bibby D, Lythgow K, *et al.* Enhanced surveillance of HIV-1 transmitted drug
230 resistance and transmission clusters in recently infected UK MSM. *Antivir Ther* 2014; **19 Suppl 1**:
231 A30.
- 232 7. Garcia-Diaz A, McCormick A, Booth C, *et al.* Analysis of transmitted HIV-1 drug resistance using
233 454 ultra-deep-sequencing and the DeepChek[®]-HIV system. *J Int AIDS Soc* 2014; **17**: 19752.

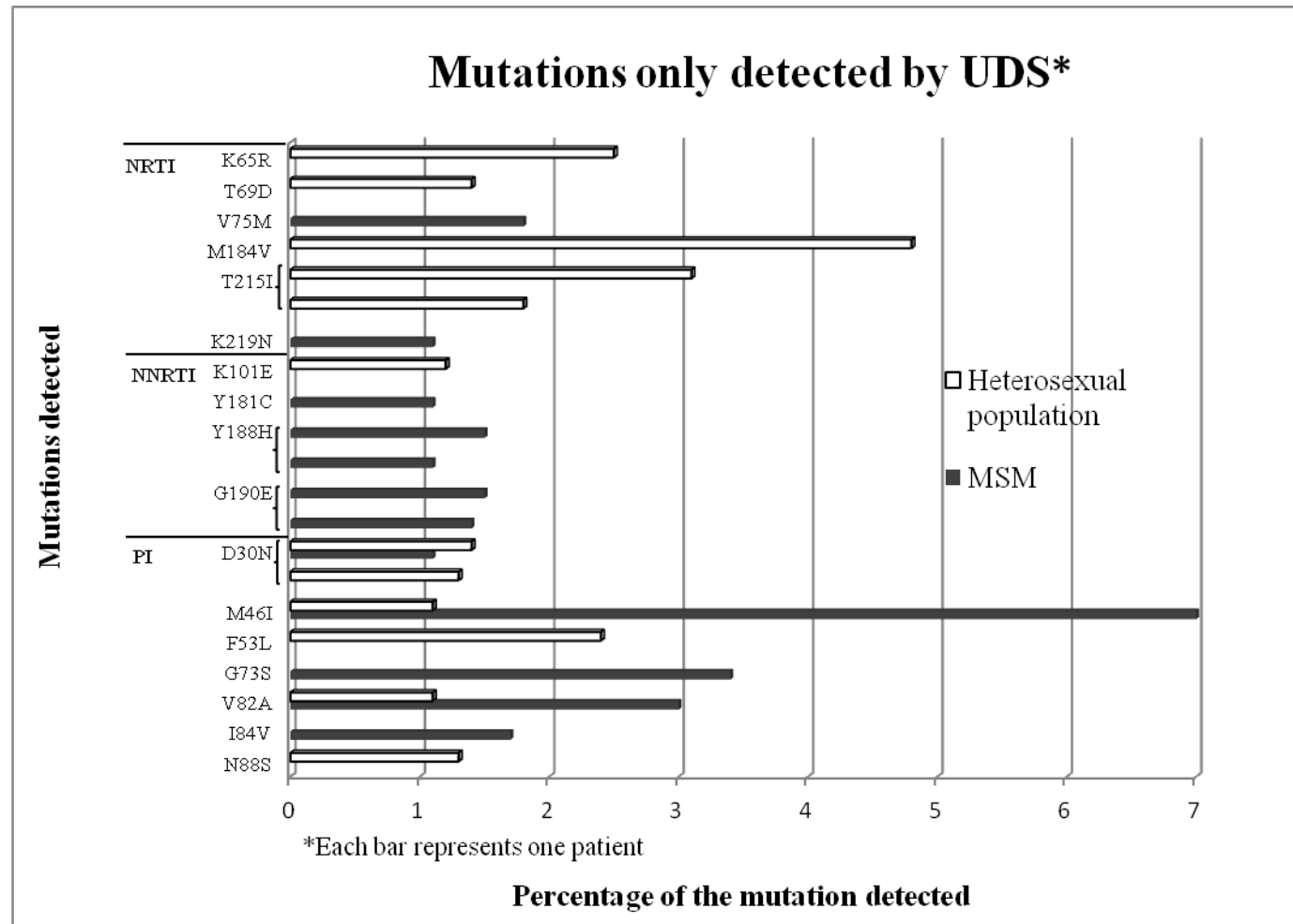
- 234 8. Descamps D, Delaugerre C, Masquelier B, *et al.* Repeated HIV-1 resistance genotyping external
235 quality assessments improve virology laboratory performance. *J Med Virol* 2006; **78**: 153–60.
- 236 9. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, *et al.* Drug resistance mutations for surveillance of
237 transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS One* 2009; **4**: e4724.
- 238 10. Todesco E, Rodriguez C, Morand-Joubert L, *et al.* Improved detection of resistance at failure to
239 a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing. *J Antimicrob*
240 *Chemother* 2015; **70**: 1503–6.
- 241 11. Daigle D, Simen BB, Pochart P. High-throughput sequencing of PCR products tagged with
242 universal primers using 454 life sciences systems. *Curr Protoc Mol Biol Ed Frederick M Ausubel Al*
243 2011; **Chapter 7**: Unit7.5.
- 244 12. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, *et al.* Characterization of mutation spectra with ultra-deep
245 pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007; **17**: 1195–201.
- 246 13. Frange P, Assoumou L, Descamps D, *et al.* HIV-1 subtype B-infected MSM may have driven the
247 spread of transmitted resistant strains in France in 2007-12: impact on susceptibility to first-line
248 strategies. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2084–9.
- 249 14. Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C, *et al.* Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at
250 baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response. *J Antimicrob*
251 *Chemother* 2015; **70**: 2090–6.
- 252 15. Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, *et al.* Study of genotypic and phenotypic HIV-1
253 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: a refined analysis by ultra-deep 454
254 pyrosequencing. *J Infect Dis* 2012; **205**: 557–67.
- 255

Table 1: Global prevalence of Transmitted Drug Resistance (TDR) and by drug classes among the 2 groups: MSM and heterosexual patients.

	Sanger sequencing			UltraDeep sequencing		
	MSM n=70	Heterosexual population n=70	p value	MSM n=70	Heterosexual population RT n=54 Protease n=67	p value
Global prevalence of TDR	n= 3 4.3%	n= 5 7.1%	0.47	n= 13 18.6%	n=16 22.8%	0.53
[95% CI]	[0.0%-9.1%]	[0.9%-13.4%]		[9.4%-27.7%]	[12.7%-33.0%]	
Prevalence of NRTI-TDR	n= 1 1.4%	n= 3 4.3%	0.31	n= 3 4.3%	n= 8 14.8%	0.04
[95% CI]	[0.0%-4.2%]	[0.0%-9.2%]		[0.0%-9.1%]	[5.3%-24.4%]	
Prevalence of NNRTI-TDR	n= 2 2.9%	n= 3 4.3%	0.65	n= 7 10.0%	n= 4 7.4%	0.61
[95% CI]	[0.0%-6.8%]	[0.0%-9.2%]		[2.9%-17.1%]	[0.4%-14.5%]	
Prevalence of PI-TDR	n=0 0.0%	n= 1 1.4%	0.32	n= 5 7.1%	n= 7 10.4%	0.49
[95% CI]		[0.0%-4.3%]		[1.1%-13.2%]	[3.1%-17.8%]	

MSM: Men Men having Sex with Men; NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; NNRTI: Non NRTI; PI: Protease Inhibitors; TDR: Transmitted Drug Resistance

Figure 1. Percentage of Transmitted Drug Resistance mutations only detected by UDS among the 2 groups: MSM and heterosexual patients



MSM: Men having Sex with Men; NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; NNRTI: Non NRTI; PI: Protease Inhibitors

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkv013

Ultradeep sequencing in the therapeutic management of HIV-1 infection at treatment initiation

Eve Todesco^{1-4*}, Mélanie Mercier-Darty⁵,
Matthieu Jung^{6†}, Julie Bottero⁷, Anders Boyd²,
Anne-Geneviève Marcelin¹⁻³, Vincent Calvez¹⁻³
and Laurence Morand-Joubert^{1,2,4}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S_1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; ²INSERM, UMR S_1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; ³Department of Virology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France; ⁴Department of Virology, Hôpital Saint Antoine, APHP, Paris, France; ⁵Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, APHP, Université Paris-Est, Créteil, France; ⁶Institut de Biologie Computationnelle, LIRMM, UMR 5506 CNRS–Université Montpellier 2, Montpellier, France; ⁷Department of Infectious Diseases, Hôpital Saint Antoine, APHP, Paris, France

*Corresponding author. Department of Virology, Bât CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.
Tel: +33-1-42177401; Fax: +33-1-42177411;
E-mail: eve.todesco@psl.aphp.fr

†Present address: IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), INSERM, U596, CNRS, UMR7104, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch cedex, France.

Keywords: HIV-1 drug resistance, minority variants, virological failure, resistance genotyping

Sir,

In treatment-naïve patients infected with HIV-1, studies using bulk sequencing have shown that 10% harbour treatment resistance mutations.¹ Without selective pressure, gradual loss of resistance mutations has been observed previously, especially for mutations that reduce the capacity of viral replication. In the case report herein, we present an HIV-infected patient exhibiting substantial decreases in the proportion of several treatment resistance mutations.

A patient tested positive for HIV-1 in June 2013 without clinical symptoms. At the initial consultation, plasma HIV-1 RNA viral load was 423 700 copies/mL (5.6 log₁₀ copies/mL) and Sanger sequencing revealed heavily mixed populations of resistance mutations on the reverse transcriptase (RT) gene (M184M/V, K103N/R/S and Y188Y/L). The viral subtype was CRF02_AG and the CD4 cell count was 217/mm³. Hepatitis C serology was negative and hepatitis B serology showed a past infection. After 1 week without any ART, the viral load remained steady at 262 300 copies/mL (5.4 log₁₀ copies/mL), while HIV-1 genotyping from a second plasma sample demonstrated only the K103N/R/S mutations.

These two samples were then further analysed using ultradeep sequencing (UDS). Results of the mutational load, defined as the product of HIV-1 RNA viral load and mutation percentage, are illustrated in Figure 1 for both samples. In the initial plasma sample, all resistance mutations were observed as above, yet additional resistance mutations at positions M41L, V106I and V179I were uncovered. The second plasma sample 1 week later showed the same mutational patterns as the first sample; however, large decreases in the proportion of all mutations were observed except for K103N/R/S, while the V106I mutation was completely undetectable. It should be noted that the M184V and Y188L mutations in the second sample were detected using UDS, but not via Sanger sequencing as the mutational load was below the detection threshold.

After taking into account the resistance mutation patterns observed first, the patient initiated ART containing abacavir, tenofovir and atazanavir/ritonavir. After 5 months of treatment, the HIV-1 RNA viral load declined considerably to 134 copies/mL. Proviral HIV-1 DNA was then extracted from PBMCs and sequenced using both methods: Sanger sequencing was only able to show the K103N mutation, while UDS detected the M41L (28.8%), K103N (29.36%) and M184V (4.6%) mutations. RT sequencing was performed by UDS in two separate fragments. For each sample, genetic linkage was observed between the M41L and K103N mutations in the first fragment (amino acids 17–140) and also between the V179I/M184V and Y188L mutations in the second fragment (amino acids 133–247).

Mutants with a negative impact on viral fitness generally disappear over time.^{2,3} In this patient, we noticed that the mutations reverting back to WT were typically associated with low viral fitness (i.e. M184V),^{4,5} whereas mutations unable to do so persisted at the same levels.⁶ One explanation for these findings could be that the patient had primary infection with the loss of primary mutations. This process takes much longer among patients with transmitted HIV resistance compared with those discontinuing treatment after acquiring resistance, whereupon WT virus re-emerges.⁷ However, the HIV-1 western blot was strongly positive and an antibody avidity test performed on the first sample estimated the infection to have occurred ≥6 months previously. The patient could also have had HIV-1 superinfection. Nevertheless, we conducted phylogenetic tree analysis from UDS of the first sample, while regrouping consensus sequences differing by no more than one nucleotide together (using PhyML on Seaview software,⁸ with a GTR+I+G4 substitution model and reference strain HXB2 as an outgroup). This analysis strongly suggested quasi-species evolution from the same origin (data not shown), leaving superinfection an unlikely possibility. Finally, this patient may have inadvertently taken ART before his initial consultation. Stored plasma samples were obtained from clinical visits at his initial HIV diagnosis and were tested for the presence of nevirapine and efavirenz, showing undetectable concentrations.

Regardless of the reasons why a rapid decline in quasi-species of certain HIV-resistant mutations occurred within 1 week, this case report clearly demonstrates the superiority of next-generation sequencing compared with conventional sequencing

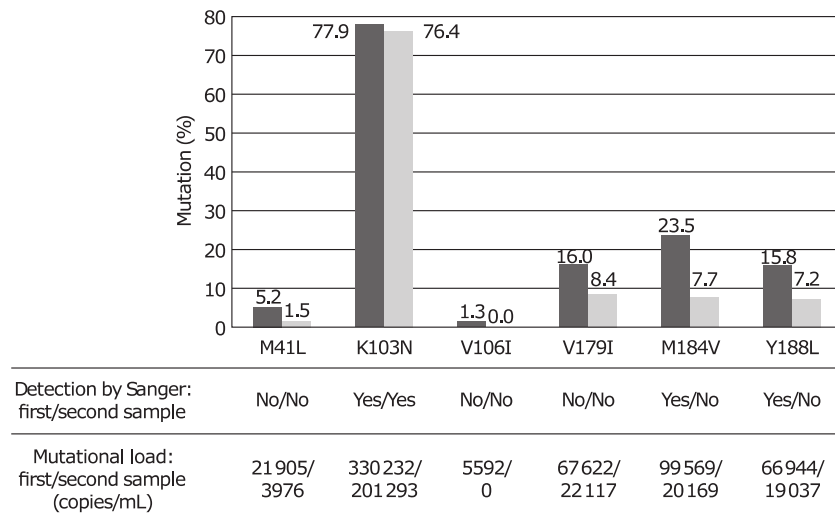


Figure 1. RT mutations detected by UDS (first sample in dark grey; second sample in light grey).

when determining HIV-1 resistance. If Sanger sequencing alone was performed on the second sample, with results showing only the K103N/R/S mutation, this patient might have initiated another ART regimen, such as the common combination of tenofovir, emtricitabine and rilpivirine. In this instance, the unobserved resistance mutations, which would have otherwise been detected with UDS, would have increased due to treatment-induced selective pressures and thus increased the risk of treatment failure.^{9,10}

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'—grant agreement no. 223131.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Descamps D, Assoumou L, Chaix M-L et al. National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001–2011. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2626–31.
- Jain V, Suppirala MC, Bacchetti P et al. Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J Infect Dis* 2011; 203: 1174–81.

- Devereux HL, Youle M, Johnson MA et al. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999; 13: F123–7.

- Paredes R, Sagar M, Marconi VC et al. In vivo fitness cost of the M184V mutation in multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of lamivudine. *J Virol* 2009; 83: 2038–43.

- Brenner BG, Routy J-P, Petrella M et al. Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 2002; 76: 1753–61.

- Gianotti N, Galli L, Boeri E et al. In vivo dynamics of the K103N mutation following the withdrawal of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus-infected patients. *New Microbiol* 2005; 28: 319–26.

- Little SJ, Frost SDW, Wong JK et al. Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5510–8.

- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010; 59: 307–21.

- Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F et al. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 2014; doi:10.1093/jac/dku426.

- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ et al. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011; 305: 1327–35.

RESUME

Les mutations de résistance pour une molécule donnée sont produites avant que la molécule en question ne soit utilisée, et c'est sous « pression de sélection » que la souche résistante va être sélectionnée. Des données récentes montrent que des variants résistants minoritaires (VRMs), même représentant un très faible pourcentage de la population virale, peuvent être une source d'échec virologique. Les nouvelles techniques de séquençage sont bien plus sensibles que les techniques classiques de séquençage et permettent la détection des VRMs. Afin d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de ces techniques, nous avons étudié les prélèvements de patients en situation d'échec virologique après traitement par deux combinaisons antirétrovirales très utilisées (tenofovir/emtricitabine/efavirenz et tenofovir/emtricitabine/rilpivirine). De nombreux variants de résistance supplémentaires ont été détectés, touchant principalement la classe des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTIs), avec un impact potentiel sur le choix du traitement de relais. Nous avons également étudié la prévalence des mutations de résistance transmise sur le gène de la protéase et de la transcriptase inverse chez des patients naïfs chroniquement infectés, chez deux groupes de transmission : des patients hommes ayant des rapports avec d'autres hommes (HSH), et des patients hétérosexuels. Nous avons retrouvé une prévalence plus élevée de mutations touchant les INTIs dans le groupe des patients hétérosexuels. Parmi les patients HSH, ceux infectés par un virus de sous-type B étaient plus fréquemment infectés par un virus résistant. Cette thèse met en avant la puissance de ces techniques, dont les conditions d'utilisation ne sont pas encore complètement définies.

Mots clés: VIH-1 ; antirétroviraux ; mutations de résistance ; variabilité génétique ; séquençage haut débit ; nouvelles techniques de séquençage

ABSTRACT

Study of minority resistant variants to antiretroviral: impact on virologic response to treatment

Resistance mutations for a given molecule are produced before the molecule is used, and it is under "selection pressure" that the resistant strain will be selected. Recent data show that minority resistant variants (MRV) can be a source of virologic failure. New sequencing techniques are much more sensitive than conventional sequencing techniques and allow MRV detection. To assess the value of these new techniques, we studied samples from patients experiencing virologic failure after treatment with two antiretroviral combinations widely used (tenofovir/emtricitabine/efavirenz et tenofovir/emtricitabine/rilpivirine). Many additional resistance variants affecting the class of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) were detected, with a potential impact on the choice of the subsequent regimen. We also studied the prevalence of transmitted resistance mutations in the protease and reverse transcriptase genes among naive patients chronically infected, among two groups of transmission: patients of men who have sex with men (MSM) and heterosexual patients. We found a higher prevalence of NRTI mutations among the heterosexual group. Among MSM patients, those infected with subtype B viruses were more frequently infected with a resistant virus. This thesis highlights the power of these techniques, the conditions of use are not yet fully defined.

Keywords : HIV-1 ; antiretroviral ; resistance mutations ; genetic variability ; Ultra-Deep Sequencing ; Next Generation Sequencing