



HAL
open science

Etude des résistances du VIH-1 au traitement antirétroviral et amélioration du suivi virologique des patients vivant avec le VIH dans les pays du Sud

Emilande Guichet

► **To cite this version:**

Emilande Guichet. Etude des résistances du VIH-1 au traitement antirétroviral et amélioration du suivi virologique des patients vivant avec le VIH dans les pays du Sud. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT044 . tel-01647140

HAL Id: tel-01647140

<https://theses.hal.science/tel-01647140>

Submitted on 24 Nov 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale
**Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
(CBS2)**

Et de l'unité de recherche UMI TransVIHMI,
IRD de Montpellier, INSERM U1175, UM

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Emilande Guichet**

**Etude des résistances du VIH-1 au traitement
antirétroviral et amélioration du suivi
virologique des patients vivant avec le VIH
dans les pays du Sud**

Soutenue le 14 Novembre 2016 devant le jury composé de

M. Vincent LE MOING, PU-PH, CHU de Montpellier, France
M. Claver Anoumou DAGNRA, PR, Université de Lomé, Togo
Mme Charlotte CHARPENTIER, MCU-PH, Université Paris Diderot, France
M. Kevin ARIEN, PR, Institut de médecine tropical d'Anvers, Belgique
Mme Martine PEETERS, DRCE, IRD de Montpellier, France
M. Avelin AGHOKENG FOBANG, CR1, IRD-CREMER, Yaoundé, Cameroun

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse



Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à celles et ceux qui m'ont accompagnés le long de ce chemin doctoral franco-camerounais :

Monsieur le Professeur Eric Delaporte,

Pour m'avoir ouvert les portes de votre unité,

Pour m'avoir donné l'opportunité d'acquérir des expériences techniques et opérationnelles dans le domaine passionnant de la recherche qu'est le VIH/SIDA,

Veuille trouver ici le témoignage ma gratitude.

Madame la Directrice de recherche Martine Peeters,

Pour la confiance que vous m'avez faite en acceptant d'encadrer mon travail de thèse,

Pour votre expertise et votre parcours professionnel admirable,

Je vous exprime ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Avelin Aghokeng Fobang,

Pour avoir accepté de co-encadrer ce travail,

Pour votre accueil chaleureux au laboratoire du CREMER, et votre disponibilité à échanger sur les problématiques techniques et opérationnelles liées au Cameroun, et au pays du Sud en général

Veillez trouver ici l'assurance de mes sincères remerciements

Monsieur le Professeur Claver Anoumou Dagnra et Madame le Docteur Charlotte Charpentier,

Pour avoir accepté de lire et rapporter ce travail,

Je vous témoigne ma très vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur Vincent LE MOING,

Pour l'intérêt que vous avez accordé à ce travail en acceptant d'être président de jury,

Veillez trouver ici l'expression de mes profonds remerciements.

Monsieur le Professeur Kevin ARIEN,

Pour avoir bien voulu examiner ce travail,

Je tiens à vous remercier vivement.

Monsieur le Colonel MPOUDI NGOLE,

Pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire du CREMER, jusqu'à celles de votre bureau,

Pour votre disponibilité et votre bienveillance à rendre mon séjour au Cameroun performant sur le plan professionnel et agréable sur le plan personnel

Je vous témoigne ici de ma profonde gratitude

L'équipe du Cameroun

Parce ce que j'ai suivi les conseils de Clarisse : je chéris les moments passés et je prends une dose de « bons souvenirs » du CREMER chaque matin, comme mon café ! Parce que grâce à vous la journée de la femme ne s'arrête pas : Florian Liegeois, Eugénie Ebong, Ginette Edoul, Jenny Domyeum, Julius Chia, Landry Tsoumta, Nadine Lamarre, Bertrand Mattiké, Nicaise Kamga, Thomas Atemkeng Fotsop, Gustave Mbiandou, Innocent Ndong Bass, Aimé Mebenga, Joseph Moudindo.

Un merci infini pour votre accueil et surtout : meilleur à vous !

A tous ceux qui ont participé de près et de loin à mon travail au Cameroun

Monsieur le Professeur Christian Laurent, merci de m'avoir intégrée dans votre projet à Mfou. Je remercie aussi tous les collaborateurs : Charles Kouanfack, Chralotte Boullé, Catherine Massama IkaKa, Emile Ngock,

Aux docteurs avec qui j'ai échangé plus étroitement : Henri Achu Joko, Laura Ciaffi, Nestor Manga, et Philippe Msellati. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A Monsieur le représentant Bruno Bordage et toute l'équipe de la représentation de l'IRD à Yaoundé, en particulier : Colette Nko Likeng-Essono, Betty Penda, Mohammed Elomo Molo, Houria Boussaïd et Joseph Fumtim.

A Odile Elade du site ANRS et Robert pour son aide précieuse en informatique.

L'équipe de Montpellier

Parce que j'ai appris beaucoup auprès de vous, parce que j'ai pu compter sur vous en cas de besoin : Coralie Sigounios, Julie Pujet, Sabrina Locatelli, Julian Villabona-Arena, Laëtitia Serano, Christelle Butel, Fatima Mouacha, Hélène De Nys, Alpha Kabinet Keita.

Je tiens à remercier plus particulièrement Ahidjo Ayouba et Nicole Vidal pour leurs précieux conseils et leur grande disponibilité.

Sabrina Eymard-Duvernay, c'était un réel plaisir de travailler ensemble : merci !

Enfin, spéciale dédicace à celle qui a partagé mes joies et mes peines (en plus de son bureau), ce n'est pas terminé ! Amandine Esteban, merci du fond du cœur pour ton soutien. Deuxième dédicace spéciale à Mirela D'Arc : « Je ne regrette rien et surtout pas de t'avoir rencontré ».

Aux patients,

*Parce que l'accès aux soins est un droit universel,
Je vous souhaite d'avoir une vie meilleure*

A mes amis,

Par ce que je sais que même partie sur un autre continent, on aura toujours la même joie de se retrouver: Léna, Pauline, Sandra. Parce qu'entre nous il y a une histoire de pharma qui ne s'arrête pas, parce que grâce à vous les « week-ends » filles c'est pour la vie et parce que les plus courageuses d'entre vous sont venues me rendre visite au Cameroun, et même avant au Sénégal: Clementine, Mathilde, Sophie et Florence.

Parce que ma vie au Cameroun n'aurait pas été si pétillante sans votre soutien et votre rencontre, parce que vous me manquez : Line, Marthe, Jacqueline, Olivier et Pat et Valentin. Parce que tu es mon mbenguiste préféré, parce qu'on a encore beaucoup de choses à partager : Abdou Adedeji.

Parce que j'ai les meilleurs coloc du monde et parce que oui Stéphane, je suis effectivement restée un peu plus de quelques mois avec vous : Amandine, Anaïs, Béa, Caroline, Cybelle, Karim, Kieran, Pierre & Maéva, Thomas & Amandine C.

*A mon grand-père René Désiré, à super Manua et à Véronique, à qui je dédie cette thèse
Pour les combats admirables que vous menez, vous êtes toujours dans mes pensées*

*A ma sœur adorée,
Parce que c'est toi*

A toute ma grande famille et mes parents, parce que vous êtes là, je vous aime !



Résumé

Titre : Etude des résistances du VIH-1 au traitement antirétroviral et amélioration du suivi virologique des patients vivant dans les pays du Sud.

Quinze ans après la mise en place et l'accès élargi au traitement antirétroviral (TAR) dans les pays du Sud, la suppression virale, objectif clé de son efficacité, n'est pas atteinte chez de nombreux patients infectés par le VIH. Contrairement aux pays du Nord, où un TAR souvent plus puissant et plus robuste couplé à un suivi virologique de routine limite l'émergence de la résistance, la situation des patients vivant actuellement dans les pays du Sud est beaucoup plus préoccupante. La recherche opérationnelle menée ici vise à améliorer leur prise en charge basée sur l'approche globale de santé publique de l'OMS, et aussi leur suivi. Alors qu'elle est recommandée en routine depuis 2013, la charge virale (CV) du VIH est peu accessible et le suivi des patients reste principalement clinique voire immunologique.

Dans plusieurs pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest, nous avons documenté une multi-résistance chez presque la totalité des patients en échec virologique après une longue durée de TAR de 1^{ère} ligne, composé de 2 inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) (3TC+AZT/d4T) associés à 1 inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) (EFV/NVP). Cette résistance compromet aussi l'efficacité des INNTIs de 2^{ème} génération de façon importante, ainsi que celle du TDF qui est actuellement recommandé en 2^{ème} ligne. De façon plus inhabituelle, nous avons aussi rapporté que les CV élevées ($> 5 \log_{10}$ copies/mL) étaient associées à une multi-résistance plutôt qu'à un défaut d'observance chez ces patients largement asymptomatiques. Sans véritable amélioration du suivi, au travers un accès élargi au test de CV permettant un diagnostic précoce de l'échec virologique, une nouvelle épidémie potentielle causée par des souches résistantes pourrait émerger en Afrique sub-saharienne. Elle pourrait compromettre les efforts à réaliser pour atteindre l'objectif « 90-90-90 » (90% des infections diagnostiquées, 90% des patients diagnostiqués sous TAR, 90% des patients traités en succès virologique durable) de l'ONUSIDA et de l'OMS en 2020. En outre, notre deuxième étude menée au sein d'un hôpital de district camerounais illustre le fait que ces objectifs ambitieux seront probablement encore plus difficiles à atteindre en zones décentralisées,

disposant souvent d'infrastructures de laboratoires inadaptées pour accueillir des plateformes de CV complexes.

Nous avons ensuite transféré avec succès un test de CV ouvert et polyvalent universel au sein d'un laboratoire national de référence au Cameroun, capable de détecter les VIH-1 M, N, O et P, ainsi que leurs ancêtres simiens. Avec ce test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, nous avons mesuré une meilleure quantification des variants du VIH-1 M (+0.47 log₁₀ copies/mL), comparé au test Abbott RealTime HIV-1 approuvé par la FDA. Au seuil d'échec virologique de l'OMS (1 000 copies/mL), la concordance des résultats entre les deux tests était de 95%, avec une meilleure sensibilité pour le nouveau test.

Nous avons finalement cherché à savoir comment adapter ce test ouvert à une application optimale à grande échelle sur du sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais), pour rendre la CV accessible en zones décentralisées, en l'absence actuelle de tests de CV simples (POC, *point of care* en anglais). Nous avons comparé différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques pour réduire l'impact de l'ADN pro-viral afin d'améliorer en vain la spécificité du test sur DBS. Nous avons plutôt montré qu'avec la plupart des tests de CV par RT-qPCR, de nombreux patients pourraient être candidats pour refaire une CV de façon inappropriée (voire changer de TAR pour une 2^{ème} ligne), ce qui induirait un surcoût programmatique.

En conclusion, ces travaux de thèse ont contribué à améliorer les connaissances sur l'efficacité réelle des programmes et services de TAR, ainsi que sur l'utilisation d'outils de suivi virologique adaptés aux patients vivant avec le VIH dans les pays du Sud.

Mots clés : VIH, résistance, pays du Sud, charge virale, sang séché sur papier buvard

Abstract (résumé en anglais)

Title : Study of HIV-1 antiretroviral drug resistance and virological monitoring improvement in patients living in resource limited countries

Fifteen years after the introduction and expanded access to antiretroviral therapy (ART) in resource limited countries (RLC), viral suppression, a key objective of its effectiveness is not achieved in many patients infected with HIV. Unlike developed countries, where often more powerful and robust ART coupled with a routine virological monitoring limit the emergence of resistance, the current situation of RLC is more worrying. Operational research conducted here aims to improve care and monitoring of patients living in these countries, and receiving ART according to the WHO public health approach. While recommended routinely since 2013, HIV viral load (VL) is rarely available and monitoring remains primarily clinical or immunological.

In several countries in Central Africa and West, we documented high rates of HIV drug resistance (HIVDR) (99%) and multi-drug resistance (97%) in patients with virologic failure after long-term first-line ART, consisting of 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) (3TC + AZT / d4T) associated with 1 non-NRTI (NNRTI) (EFV / NVP). This multi-drug resistance also reduces significantly the effectiveness of second-generation NNRTIs and of the NRTI, TDF, which is now currently recommended in 2nd line by the WHO. More unusually, we also reported that high VLs (> 5 log₁₀ copies / ml) are associated with multi-resistance rather than an insufficient adherence in these patients who were largely asymptomatic. Without improvement of patient monitoring, through expanded access to VL testing to enable early diagnosis of virological failure, a potential new epidemic caused by HIVDR strains could emerge in sub-Saharan Africa. This could jeopardize efforts to achieve the "90-90-90" objective (90% of diagnosed infections, 90% of diagnosed patients on ART, 90% of patients treated durable virologic success) of UNAIDS and WHO in 2020. Moreover, our second study in a district hospital in Cameroon illustrates that these ambitious targets will probably be even more difficult to achieve in decentralized areas, often having inadequate laboratory infrastructure to acquire complex VL platforms.

We then successfully transferred an open and polyvalent universal VL assay in a national reference laboratory in Cameroon. This assay can detect HIV-1 group M, N, O and P and their simian ancestors. With this RT-qPCR HIV-1/SIVcpz/SIVgor assay, HIV-1 M variants were better quantified (+0.47 log₁₀ copies / mL) compared to Abbott RealTime HIV-1 assay which is approved by the FDA.

At the VL threshold of virological failure defined by the WHO (1000 copies/mL), the correlation of the results between the two tests was 95%, with a higher sensitivity for the new test.

We finally explored how to adapt this open test at optimal large-scale application for dried blood spot (DBS), to make VL testing available in decentralized areas, given the current lack of point of care test for VL. We compared different extraction methods of nucleic acids that could potentially reduce the contribution of the pro-viral DNA present in DBS, with the aim to improve their specificity without success. Instead, we have shown that with most of the RT-qPCR VL assays, many patients would be inappropriately eligible to perform a repeated VL testing (or switched to a costly 2nd line ART), which increase significantly costs of national programs.

In conclusion, the studies from this thesis have contributed to improve current knowledge about the effectiveness of ART programs and services and also on the use of virological monitoring tools adapted to patients living with HIV in RLCs.

Key words: HIV, drug resistance, resource limited countries, viral load, dried blood spots

Liste des publications

Associées aux travaux de thèse

✓ Deux articles acceptés

(**Chapitre 1**) AIDS Research and Human Retroviruses (ARHR). June 2016, ahead of print.
doi:10.1089/AID.2016.0010

Guichet, E., Aghokeng, A.F., Serrano, L., Bado, G., Toure-Kane, C., Eymard-Duvernay, S., Villabona-Arenas, C.-J., Delaporte, E., Ciaffi, L., and Peeters, M. (2016). **High viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives in sub-Saharan Africa.** AIDS Res. Hum. Retroviruses, *in press*.

(**Chapitre 3**) Journal of Virological Methods (VIRMET). September 2016, ahead of print.
doi:10.1016/j.jviromet.2016.09.005

Guichet, E., Aghokeng, A.F., Eymard-Duvernay S., Vidal N., Ayouba A., Mpoudi Ngole E., Delaporte, E., Ciaffi, L., and Peeters, M. (2016). **Field evaluation of an open and polyvalent universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor quantitative RT-PCR assay for HIV-1 viral load monitoring in comparison to Abbott RealTime HIV-1 in Cameroon.** Journal of Virological Methods, *in press*.

✓ Un article soumis

(**Chapitre 2**) Open Forum Infectious Diseases. October 2016, accepted.

Boullé, C.*, **Guichet, E.**, Kouanfack, C., Aghokeng, A.F., Onambany, B., Massama Ikaka, C., Ngock, E., Tsoumsta, L., Msellati, P., Mpoudi Ngole, E., Peeters, M., Delaporte, E., Laurent, C. (2016). **Virologic failure and HIV drug resistance in rural Cameroon with regard to the UNAIDS 90-90-90 treatment targets.** Open Forum Infectious Diseases.

* CB and EG contributed equally.

Autres articles publiés non associées aux travaux de thèse

- Villabona-Arenas, C.J., Vidal, N., **Guichet, E.**, Serrano, L., Delaporte, E., Gascuel, O., and Peeters, M. (2016). **In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa.** AIDS Lond. Engl., *in press*.
- Liu, W., Li, Y., Shaw, K.S., Learn, G.H., Plenderleith, L.J., Malenke, J.A., Sundararaman, S.A., Ramirez, M.A., Crystal, P.A., Smith, A.G., **et al.** (2014). **African origin of the malaria parasite Plasmodium vivax.** Nat. Commun. 5, 3346.
- Dieng, Y., Sow, D., Ndiaye, M., **Guichet, E.**, Faye, B., Tine, R., Lo, A., Sylla, K., Ndiaye, M., Abiola, A., et al. (2012). **[Identification of three Candida africana strains in Senegal].** J. Mycol. Médicale 22, 335–340.
- Slamti, L., de Pedro, M.A., **Guichet, E.**, and Picardeau, M. (2011). **Deciphering Morphological Determinants of the Helix-Shaped Leptospira.** J. Bacteriol. 193, 6266–6275.

Liste des figures

Figure 1. Phylogénie représentant les sept genres de la famille des Retroviridae.....	36
Figure 2. Structure du VIH dessiné à la main à partir des données de biologie structurale, de biophysique et de microscopie.	37
Figure 3. Structure génomique de la souche de référence du VIH-1 (HXB2, numéro d'accèsion GenBank K03455).	38
Figure 4. Assemblage et maturation du VIH.....	39
Figure 5. Schéma des étapes du cycle de réplication viral montrant présentant les différentes formes d'acides nucléiques du VIH présents dans la cellule infectée.	42
Figure 6. Mécanisme de formation d'un virus recombinant	44
Figure 7. Evolution de la charge virale (CV) ARN du VIH et du nombre de CD4 pendant l'infection à VIH et après la mise sous traitement antirétroviral (TAR).	45
Figure 8. Dynamique spatiale VIH-1 M sous-type B à travers le monde.	49
Figure 9. Phylogénie représentant la large diversité des souches issues de la lignée VIH-1/SIVcpz/SIVgor.	52
Figure 10. Distribution des sous-types et des formes recombinantes circulantes (CRFs) du VIH-1 M dans le monde, en 2007.	54
Figure 11. Carte indiquant la distribution géographique des adultes et des enfants vivant avec le VIH dans le monde en 2015, ainsi que les populations à risques.	56
Figure 12. Progrès dans la réponse à l'épidémie de VIH/SIDA à travers le monde, entre 2000 et 2015.	56
Figure 13. Evolutions chronologiques des molécules antirétrovirales approuvées par la FDA, et des différentes recommandations de l'OMS concernant le TAR dans les Pays du Sud.	62
Figure 14. Structures chimiques des principaux INTIs, analogues des dNTPs naturels.	63
Figure 15. Structures chimiques des principaux INNTIs, analogues non-nucléosidiques des dNTPs naturels.	65
Figure 16. Structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1	66
Figure 17. Structures chimiques des principaux IPs.	67
Figure 18. Structures chimiques des principaux INIs.	68
Figure 19. Schéma de la barrière génétique et de la puissance des principaux ARVs couramment utilisés.	72

Figure 20. Description du mécanisme de « pausing » lié au polymorphisme unique du VIH-1 C à l'origine d'une émergence plus rapide de la mutation K65R en présence de TDF et d4T.	73
Figure 21. Persistance des mutations transmises chez des individus naïfs de TAR.	75
Figure 22. Liste des mutations de résistance du VIH-1 aux ARVs référencées par l'IAS en 2015.	77
Figure 23. Mutations de résistance aux INTIs et INNTIs.	78
Figure 24. Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs.	83
Figure 25. Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs.	84
Figure 26. Présentation schématique de certaines sondes utilisées dans les techniques de RT-qPCR et principes d'amplification de quantification.	98
Figure 27. Principe de l'amplification isotherme de l'ARN avec la méthode NASBA.	100
Figure 28. Développement et commercialisation des plateformes simples (POC) et des plateformes complexes adaptées aux DBS.	107
Figure 29. Plateforme SAMBA Semi-Q VL.	108
Figure 30. Photographie de DBS en cours de séchage au laboratoire de virologie CREMER-IMPM de Yaoundé, au Cameroun.	110
Figure 31. Estimation du nombre de copies initiales d'acides nucléiques totaux présents sur DBS (ARN plasmatique, ARN et ADN cellulaires) en fonction de la CV plasmatique.	115
Figure 32. Schéma représentant l'impact des techniques d'extractions et d'amplifications utilisées par les plateformes de CV complexe dans la mesure des acides nucléiques présents sur les DBS.	116
Figure 33. Evolution de la couverture du TAR entre 2010 et 2015, en fonction des régions du monde.	123
Figure 34. Projection sur les progrès à venir dans la réponse accélérée à l'épidémie de VIH/SIDA à travers le monde, entre 2015 et 2030.	125
Figure 35. Stratégies de mesures de la CV pour détecter ou confirmer un échec thérapeutique et changer de TAR chez l'adulte, l'enfant et l'adolescent.	133
Figure 36. Stratégie pour le suivi et la surveillance de la résistance du VIH aux ARVs.	135
Figure 37. Evolution des différents marqueurs de l'échec thérapeutique et émergence des résistances du VIH aux ARVs au fil du temps.	137
Figure 38. Probabilité de changement de TAR en fonction du type de suivi.	138

Figure 39. Carte illustrant par pays les lignes directrices et la disponibilité de la CV dans 54 pays du Sud, en 2014.....	139
Figure 40. Besoins couverts et non couverts en tests de CV en Afrique subsaharienne, en 2014.	140
Figure 41. Organisation de la pyramide de soins dans les pays du Sud.	142
Figure 42. Evolution de la résistance transmise dans les pays du Nord et du Sud.	147
Figure 43. Prévalence des mutations de résistance transmises (TDR).	149
Figure 44. Prévalence des mutations de résistance acquises (ADR).	150
Figure 45. Résistances acquises du VIH au TAR.	151
Figure 46. Prévalence du VIH au Cameroun chez les adultes, en 2011.	163
Figure 47. HIV-1 drug resistance (HIVDR) to first-line drugs.	174
Figure 48. Study flowchart.	186
Figure 49. Antiretroviral regimen at treatment initiation and at the time of the study.	187
Figure 50. Prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance by time on ART.....	190
Figure 51. Genotypic NRTI and NNRTI-associated resistance mutations.	190
Figure 52. Correlation between the two assays for HIV-1 RNA quantification.	207
Figure 53. Bland-Altman difference plot comparing the quantifiable HIV-1 RNAi vral loads measured with the two assays among a large diversity of HIV-1 non-B variants (n= 356).	208
Figure 54. Analyse de la concordance par Bland-Altman, entre les CV DBS par rapport aux CV plasmatiques mesurées avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor.	231
Figure 55. Comparaison entre les extractions Abbott et NucliSENS, sur les paires de DBS quantifiées avec le test de CV VIH-1/SIVcpz/SIVgor (n=88).	232
Figure 56. Analyse de la concordance par Bland-Altman du test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor par rapport au test Biocentric pour mesurer la CV sur toutes les paires quantifiables.	239
Figure 57. Performance de l'indicateur EW3 « pas de rupture de stock » sur 13 sites urbains (U) et ruraux (R) étudiés en 2013 au Cameroun.	245

Liste des tableaux

(Français/*Anglais*)

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des principales plateformes de charge virale commerciales « fermées » présentées dans ce chapitre.	101
Tableau 2. Schémas thérapeutiques recommandés par l’OMS dans les pays du Sud en 2016.	128
Tableau 3. Utilisation combinée du statut clinique, du nombre de CD4 et de la CV pour guider le changement de TAR (modifié d’après WHO, 2006).	131
Tableau 4. Echecs virologiques (CV > 1 000 copies/mL) et résistance dans les zones urbaines des pays d’Afrique de l’Ouest et du Centre, après 12 et 24 mois de TAR.	144
Table 5. Baseline characteristics of patients.	188
Table 6. Factors associated with unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance using logistic regressions.	191
Table 7. Discordant VL results between the new universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR and Abbott RealTime HIV-1 assays.....	210
Tableau 8. Sensibilité, spécificité et exactitude pour détecter l’échec virologique avec les différentes stratégies d’extractions sur DBS couplées au test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, aux seuils de 1 000 et 5 000 copies/mL.	229
Tableau 9. Sensibilité, spécificité et exactitude pour détecter l’échec virologique avec les différents kits de CV, aux seuils de 1 000 et 5 000 copies/mL.	233
Tableau 10. Proposition des recommandations opérationnelles basées ce travail de thèse. .	258

Liste des molécules antirétrovirales (ARVs)

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudine
COBI	Cobicistat
d4T	Stavudine
ddI	Didanosine
DRV	Darunavir
DTG	Dolutégravir
EFV	Efavirenz
ETV	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FTC	Emtricitabine
FPV	Fosamprénavir
IDV	Indinavir
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
NVP	Névirapine
RAL	Raltégravir
RPV	Rilpivirine
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TAF	Ténofovir alafénamide fumarate
TDF	Ténofovir disoproxil fumarate
TPV	Tipranavir

Liste des acides aminés

(Acide Aminé / Abréviation 3-Lettres / Abréviation 1-Lettre)

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

Liste des abréviations

(Français/*Anglais*)

µL	microlitre
Å	ångström (unité de longueur valant 0,1 nanomètre)
°C	degré Celsius
ADN / <i>DNA</i>	acide désoxyribonucléique / <i>deoxyribonucleic acid</i>
ADNc	ADN complémentaire
ADR	résistance acquise / <i>acquired drug resistance</i> en anglais
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales
APOBEC3G	polypeptide 3G d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm/ <i>Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like editing complex 3G</i>
ARN / <i>RNA</i>	acide ribonucléique / <i>ribonucleic acid</i>
ARNm	ARN messenger
ARVs	antirétroviraux / <i>antiretroviral drugs</i>
bDNA	<i>branched DNA signal amplification</i>
BID	deux fois par jour / <i>twice daily</i> en anglais
CA	capside
CCR5	récepteurs chimiokines de surface C-C type 5 / <i>C-C chemokine Receptor type 5</i>
CD4	lymphocyte T porteur de récepteur CD4 (cluster de différenciation de type 4)
CD8	lymphocyte T porteur de récepteur CD8 (cluster de différenciation de type 8)
CDC	Centres pour le Contrôle et la prévention des maladies / <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE	conforme aux exigences
CI	contrôle interne
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
CREMER	Centre de Recherche sur les Maladies Emergentes et Ré-émergentes (Yaoundé, Cameroun)
CRF	formes recombinantes circulantes / <i>Circulating Recombinant Forms</i>
cp	comprimé

CPI	complexe de pré-intégration
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CV / VL	charge virale / <i>viral load</i>
CXCR4	récepteurs chimiokines de surface C-X-C type 4 / <i>C-X-C chemokine Receptor type 4</i>
DBS	sang séché sur papier buvard / <i>Dried Blood Spot</i>
dNTP	déoxynucléosides triphosphates
DPS	plasma séché sur papier buvard / <i>Dried Plasma Spot</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique / <i>ethylenediaminetetraacetic acide</i>
ELISA	test immuno-enzymatique / <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>Env</i>	enveloppe / <i>envelope</i>
EI / IQR	écart interquartile / <i>interquartile range</i>
EI	échec immunologique
EIAV	virus de l'anémie infectieuse des équidés
ESRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
ET / SD	écart-type / <i>standard deviation</i>
EV	échec virologique
<i>EWI</i>	indicateur d'alerte précoce / <i>early warning indicators</i>
FDA	agence de santé américaine / <i>Food and Drug Administration</i>
FIV	virus de l'immunodéficience féline
<i>gag</i>	antigène spécifique de groupe / <i>group-specific antigen</i>
GALT	tissu lymphoïde associé au tube digestif / <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
gp41	glycoprotéine transmembranaire 41
gp120	glycoprotéine de surface 120
gp160	précurseur glycoprotéine 160
GSS	score génotypique de sensibilité / <i>genotypic suceptibility score</i>
h	heure
<i>HIVDR</i>	résistance du VIH aux antirétroviraux / <i>HIV drug resistance</i>
HTLV	virus T-lymphotrope humain / <i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>
HSH / MSM	hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes / <i>men who have sex with men</i>
IAS	<i>International AIDS Society</i>

IDU	Usagers de drogues injectables / <i>Injecting Drug Users</i>
IMPM	Institut Médical des Plantes Médicinales (Yaoundé, Cameroun)
IN	intégrase / <i>Integrase</i>
INI	inhibiteur d'intégrase / <i>integrase inhibitor</i>
INNTI / <i>NNRTI</i>	inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse / <i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
INTI / <i>NRTI</i>	inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse / <i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
INSERM	Institut National de la santé et de la recherche médicale
IP	Inhibiteur de la protéase / <i>protease inhibitor</i>
IRD	Institut de Recherche pour le Développement (Montpellier, France)
IRIS	syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire
ISAARV	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
IST	infection sexuellement transmissible
kDa	kilodalton
LAV	virus associé à une lymphadénopathie / <i>Lymphadenopathy Associated Virus</i>
LDI	limite de détection inférieure / <i>lower detection limit</i>
log ₁₀	logarithme décimal
LTR	longues répétitions terminales / <i>Long Terminal Repeats</i>
MA	matrice
Mg	Magnésium
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
Mn	Manganèse
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NASBA	<i>nucleic acid sequence-based amplification</i>
NC	nucléocapside
<i>nef</i>	facteur négatif / <i>negative facteur</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>

OMS / <i>WHO</i>	Organisation Mondiale de la Santé / <i>World Health Organization</i>
ONU / <i>UNO</i>	Organisation des Nations Unies / <i>United Nations Organization</i>
ONUSIDA / <i>UNAIDS</i>	Organisation des Nations Unies pour la lutte contre le VIH/SIDA / <i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
PBMC	les cellules mononuclées du sang périphérique / <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	tampon de phosphate salin / <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaîne / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
QD	une fois par jour / <i>once daily</i>
p6	protéine 6
p17	protéine 17
p24	protéine 24
pb / <i>bp</i>	paires de bases / <i>base pairs</i>
PDR	résistance pré-thérapeutique / <i>pre-treatment drug resistance</i>
PNH / <i>NHP</i>	Primates Non-Humains / <i>Non-Human Primates</i>
POC	test simple / <i>point of care</i>
<i>pol</i>	polymérase / <i>polymerase</i>
PrEP	prophylaxie pré-exposition / <i>Pre-Exposure Prophylaxis</i>
PTME	prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant
PR	Protéase / <i>Protease</i>
Pr55 ^{Gag}	Protéine précurseur 55 ^{Gag}
Pr160 ^{Gag-Pol}	Protéine précurseur 160 ^{Gag-Pol}
RLC	Pays du Sud / <i>Resource limited country</i>
RC	République du Congo
RCA	République Centrafricaine
RDC / <i>DRC</i>	République Démocratique du Congo / <i>Democratic Republic of Congo</i>
Rev	protéine régulatrice de l'expression du VIH / <i>HIV Regulator of Virion expression</i>
RNase H	ribonucléase H
RT	Transcriptase Inverse / <i>Reverse Transcriptase</i>
RT-qPCR	RT-PCR quantitative / <i>Reverse Transcription quantitative PCR assay</i>
SAMBA	<i>simple amplification-based assay</i>
SAMHD1	protéine type 1 contenant les domaines SAM et HD / <i>SAM domain and HD domain 1</i>

sec	seconde
SFV	spumavirus simien / <i>Simian Foamy Virus</i>
SIDA / AIDS	Syndrome de l'Immune Déficience Acquis / <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
SIV	virus de l'immunodéficience simienne / <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIVcpz (<i>Ptt</i>)	SIV du chimpanzé (<i>Pan troglodytes troglodytes</i>)
SIVgor	SIV du gorille
SIVsmm	SIV du mangabey enfumé / <i>sooty mangabey monkeys</i>
SU	surface
TAMs	mutations associées aux analogues de la thymidine / <i>thymidine analogue mutations</i>
TAR / ART	Traitement antirétroviral / antiretroviral treatment
Tat	protéine trans-activatrice du VIH / <i>HIV-Trans-Activating</i>
TDR	résistance transmise / <i>transmitted drug resistance,</i>
TM	transmembranaire
UM	Université de Montpellier
UMI233-TransVIHMI	Unité Mixte Internationale 233 recherche translationnelle sur le VIH et les maladies infectieuses
URF	formes recombinantes uniques / <i>Unique Recombinant Forms</i>
<i>vif</i>	facteur d'infectivité viral / <i>viral infectivity factor</i>
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH /HIV	Virus de l'Immunodéficience Humaine / <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
VIH-1 / <i>HIV-1</i>	VIH de type 1
VIH-2 / <i>HIV-2</i>	VIH de type 2
VISNA	virus Maëdi-visna ou lentivirus des ovins
<i>vpr</i>	protéine virale R / <i>viral protein R</i>
<i>vpu</i>	protéine virale unique / <i>viral protein unique</i>
<i>vpx</i>	protéine virale X / <i>viral protein X</i>

Sommaire

Remerciements	1
Abstract (résumé en anglais)	7
Liste des publications	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des molécules antirétrovirales	15
Liste des acides aminés	16
Liste des abréviations	17
Sommaire.....	21
PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique	29
Chapitre 1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine.....	31
1.1 Histoire de la découverte du VIH/SIDA	33
1.2 Généralités sur le VIH.....	35
1.2.1 Taxonomie et structure.....	35
1.2.2 Organisation génétique du VIH	37
1.2.2.1 Gènes de structure du VIH : gag, pol et env	38
1.2.2.2 Gènes régulateurs et accessoires du VIH	40
1.2.3 Cycle de réplication virale	40
1.2.3.1 Phase précoce	41
1.2.3.2 Phase tardive	43
1.2.3.3 Origine de la diversité génétique et recombinaisons du VIH.....	43
1.2.4 L'histoire naturelle de l'infection à VIH/SIDA	44
1.2.4.1 Phase de primo-infection.....	45
1.2.4.2 Phase de latence clinique ou asymptomatique	46
1.2.4.3 Phase symptomatique aboutissant au SIDA.....	47

1.3 Origine et diversité génétique du VIH	47
1.3.1 « <i>Au bon endroit, au bon moment</i> » : origine et diffusion du VIH-1 M	47
1.3.2 Origine zoonotique du VIH et risque d'émergence	49
1.3.3 Classification du VIH	51
1.3.3.1 VIH-1 : 4 groupes (M,N,O et P), 9 sous-types (A-K) et presque 80 CRFs	51
1.3.3.2 VIH-2 : 9 groupes (A-I)	52
1.3.4 Epidémiologie moléculaire du VIH-1	53
1.3.4.1 Diversité génétique des VIH-1 circulant en Afrique sub-saharienne.....	53
1.3.4.2 Variants du VIH-1 circulant dans les autres régions du monde	54
1.4 Epidémiologie mondiale du VIH	55
Chapitre 2. Antirétroviraux	59
2.1 Principales molécules	61
2.1.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	63
2.1.1.1 Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse.....	63
2.1.1.2 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse	64
2.1.2 Inhibiteurs de la protéase	67
2.1.3 Inhibiteurs d'intégrase et l'arrivée du Dolutégravir au Sud.....	68
2.2 Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales	70
2.2.1 Origine et sélection de la résistance	70
2.2.1.1 Principes	70
2.2.1.2. Déterminants de la résistance du VIH-1 aux ARVs.....	71
2.2.1.3 Fitness des souches résistantes et persistance des TDR	74
2.2.2 Mécanismes de résistance et mutations associées.....	75
2.2.2.1 Résistance aux INTIs	78
2.2.2.2 Résistance aux INNTIs.....	82
2.2.2.3 Résistance aux IPs	82

2.2.2.4 Résistance aux INIs	84
2.3 Analyse et interprétation de la résistance.....	85
2.3.1 Généralités sur les tests de résistance	85
2.3.2 Interprétation des mutations de résistance	87
Chapitre 3. Charge virale et sang séché sur papier buvard	89
3.1 Présentation générale	91
3.1.1 Définition	91
3.1.2 Méthodes immuno-enzymatiques	92
3.1.3 Techniques moléculaires et enjeux de développement	93
3.1.3.1 Développement des techniques moléculaires.....	93
3.1.3.2 Techniques moléculaires et diversité génétique du VIH.....	94
3.1.3.3 Techniques moléculaires et tests de CV « ouverts ».....	95
3.2 Plateformes de charge virale complexes.....	96
3.2.1 Plateformes commerciales « fermées ».....	96
3.2.1.1 Abbott Real-Time HIV-1 VL (Abbott molecular, USA, IL).....	97
3.2.1.2 Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 (Roche Molecular Systems)	99
3.2.1.3 NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 (BioMérieux, Craponne, France).....	99
3.2.1.4 Comparaison des tests de CV Abbott Real-Time HIV-1 VL, Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 et NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 pour la quantification plasmatique des VIH-1	101
3.2.2 Plateformes de charge virale « ouvertes »	103
3.2.2.1 Generic HIV charge virale (Biocentric, Bandol, France).....	103
3.2.2.2 RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor	105
3.3 Plateformes de charge virale simples : « Point of care ».....	106
3.3.1 SAMBA Semi-Q VL (DDDU, Cambridge, Angleterre)	108
3.3.2 GeneXpert® HIV-1 VL (Cepheid, CA, USA).....	109
3.4 Le prélèvement de sang séché sur papier buvard (DBS)	110
3.4.1 Préparation et stockage des DBS	110

3.4.2 Applications : diagnostic précoce, test de résistance et suivi virologique sur DBS	111
3.4.3 Limites d'utilisation du DBS pour le suivi virologique	112
3.4.3.1 Sensibilité inférieure au plasma	112
3.4.3.2 Impact des acides nucléiques et de l'ADN proviral	114
3.4.3.3 Comparaison des plateformes de CV au seuil de 1 000 copies/mL	115
Chapitre 4. Contexte de la prise en charge et du suivi dans les pays du Sud	119
4.1 Accès au traitement antirétroviral	121
4.1.1 La « R » évolution antirétrovirale	121
4.1.2 Objectifs ONUSIDA en 2030 : « vers la fin de l'épidémie ? »	124
4.2 Le traitement de 1^{ère} et 2^{ème} ligne	126
4.2.1 Recommandations de mise sous traitement	126
4.2.2 Schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS	127
4.2.2.1 Traitement antirétroviral de 1 ^{ère} ligne	127
4.2.2.2 Traitement antirétroviral de 2 ^{ème} ligne (voire 3 ^{ème} ligne)	128
4.2.2.3 La PrEP	129
4.3 Accès au suivi virologique et échec thérapeutique	130
4.3.1. Place de la charge virale au fil des recommandations de l'OMS	130
4.3.2. Echec thérapeutique dans les pays du Sud	132
4.3.2.1 Définition de l'OMS en 2016	132
4.3.2.1 Importance de l'observance pour limiter le risque d'échec thérapeutique	133
4.3.2.2 Place du test génotypique de résistance dans les pays du Sud	134
4.3.3. Avantages du suivi virologique recommandé par l'OMS comparé aux autres suivis	136
4.3.3. Indisponibilité du test de charge virale dans les pays du Sud	139
4.3.3.1 Coût des tests de charge virale	140
4.3.3.2 Enjeux programmatiques	141
4.4 Epidémiologie de l'échec virologique et dynamique de la résistance	143

4.4.1. Echec virologique et changement de TAR dans les pays du Sud	143
4.4.2. Dynamique de la résistance : comparaison Nord/Sud	146
4.4.2.1 Résistance transmise du VIH aux ARVs.....	146
4.4.2.2 Résistance acquise du VIH aux ARVs.....	149
Objectifs	153
DEUXIEME PARTIE : Travaux de thèse	159
Contexte : situation épidémiologique et prise en charge de l'infection à VIH/SIDA dans les pays où les travaux de thèse ont été réalisés	161
Chapitre 1. Les charges virales élevées et les multi-résistances liées aux changements tardif de traitement antirétroviral de 2^{ème} ligne pourraient être un obstacle majeur à la réalisation des objectifs « 90-90-90 » de l'ONUSIDA en Afrique sub-saharienne	165
Résumé.....	167
Abstract	170
Short communication	171
Chapitre 2. Echec virologique et résistance en zone rurale au Cameroun, au regard de l'objectif « 90-90-90 » de l'ONUSIDA	177
Résumé.....	179
Abstract	182
2.1 Introduction	183
2.2 Methods	184
2.2.1 Study design.....	184
2.2.2 Laboratory testing	184
2.2.3 Statistical analysis	185
2.3 Results.....	186
2.3.1 Patients' characteristics.....	186
2.3.2 Virologic outcomes	189
2.4 Discussion	192

Chapitre 3. Evaluation « sur le terrain » d'un test de charge virale ouvert et polyvalent universel de RT-PCR quantitative VIH-1/SIVcpz/SIVgor pour le suivi virologique, en comparaison au test Abbott HIV-1 RealTime HIV-1, au Cameroun 195

Résumé.....	197
Abstract	200
3.1 Introduction	201
3.2 Material and Methods	203
3.2.1 Study population, sample collection and processing	203
3.2.2 HIV-1 RNA viral load quantification	204
3.2.3 Genotyping and classification of HIV-1 variants	204
3.2.4 Statistical analysis	205
3.3 Results.....	206
3.3.1 HIV-1 genetic diversity of the samples used in the comparative analysis	206
3.3.2 Comparison of the VL results between Abbott RealTime HIV-1 and the universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR.	206
3.3.3 Comparison of VL at the threshold of 3.00 log ₁₀ copies/mL and implications for patients in resource-limited countries	208
3.4 Discussion	211
3.5 Conclusions.....	212

Chapitre 4. Comparaison de 3 méthodes d'extraction des acides nucléiques sur DBS en vue de réduire l'impact de l'ADN pro-viral dans la mesure de la CV VIH-1 par RT-qPCR et d'adapter le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor à l'utilisation sur DBS..... 215

Résumé.....	217
4.1 Introduction	219
4.2 Objectifs.....	221
4.3 Matériel et méthodes	222
4.3.1 Collecte, préparation et sélection des paires de plasma et de DBS	222
4.3.2 Extraction des acides nucléiques et détermination de la CV plasmatique.....	222
4.3.3 Extraction des acides nucléiques et détermination de la CV DBS	223

4.3.4 Analyses statistiques	225
4.4 Résultats	226
4.4.1 Sélection des paires de plasma et DBS	226
4.4.2 Analyse des résultats au seuil de 1 000 copies/mL, avec les différentes méthodes d'extractions des DBS.....	226
4.4.3 Analyse des résultats DBS au seuil de 5 000 copies/mL	228
4.4.4 Comparaison des extractions Abbott et NucliSENS sur DBS	230
4.4.5 Comparaison des CV DBS mesurées avec les tests Abbott RealTime HIV-1, RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor et Generic HIV CV	234
4.5 Discussion	234
4.6 Conclusion et perspectives	237
4.7 Analyses complémentaires : Comparaison des tests VIH-1/SIVcpz/SIVgor et Generic HIV Charge virale (Biocentric) pour la mesure des charges virales plasmatiques	239
Conclusions et perspectives	241
Discussion	243
1. Etude des résistances acquises après une longue durée de TAR.....	243
2. Amélioration du suivi virologique dans les pays du Sud	248
Perspectives	250
1. Quel est l'impact des multi-résistances acquises au cours du TAR de 1 ^{ère} ligne sur l'efficacité des TAR de 2 ^{ème} ligne ?	250
2. Quel est le risque d'émergence d'une épidémie avec des souches VIH résistantes ?	252
3. Quel est l'impact de l'accès élargi au TDF en TAR de 1 ^{ère} ligne sur l'émergence de la résistance acquise dans les pays du Sud ?.....	253
4. Quel est l'impact de l'arrivée d'EFV ₄₀₀ et DTG dans le TAR de 1 ^{ère} ligne sur l'émergence de la résistance acquise dans les pays du Sud ?	254
5. Comment continuer la recherche virologique pour améliorer l'accès à la CV ?.....	255
Recommandations opérationnelles	257
Bibliographie	261
Annexe	310

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE

Chapitre 1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1.1 Histoire de la découverte du VIH/SIDA

Le 5 juin 1981, les premiers cas de syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ont été décrits dans le bulletin hebdomadaire « *Morbidity and Mortality Weekly Report* » (MMWR) de l'agence de santé et de sécurité publique américaine (Centres pour le Contrôle et la prévention des maladies(CDC), 1981a). Six mois plus tard, ils seront publiés dans la revue scientifique « *The New England Journal of Medicine* » (Gottlieb, 2006; Gottlieb et al., 1981). Ils concernaient cinq jeunes hommes ayant des rapports sexuels avec les Hommes (HSH) (29-33 ans) qui avaient été pris en charge dans trois hôpitaux de Los Angeles, aux Etats-Unis. Ils présentaient généralement une fièvre prolongée et une immunodéficience profonde associée à des infections opportunistes extrêmement rares, comme des pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* (anciennement *Pneumocystis carinii*), des candidoses ou des viroses à cytomégalovirus (CMV) (Redhead et al., 2006). Un mois plus tard, des cas similaires présentant des sarcomes de Kaposi liés à l'infection par l'herpès virus humain 8 (HHV8) étaient observés en Californie, ainsi qu'à New-York (CDC, 1981b).

Les termes de « cancer », « syndrome » ou « peste » associés au qualificatif de « gay » ont brièvement été utilisés pour désigner cette maladie qui affectait mortellement les HSH (CDC, 1982a). Cependant, la population affectée s'est rapidement diversifiée et s'est ainsi faite appelée « quatre H », en référence aux nouveaux cas rapportés chez les HSH mais aussi chez les Hémophiles, les usagers de drogues injectables (souvent Héroïnomanes) et les immigrés hétérosexuels Haïtiens (CDC, 1982b, 1982c; Pitchenik et al., 1983). A la fin de l'année 1982, cette maladie de cause inconnue est nommée SIDA par le CDC. Après avoir rapidement mis hors de cause l'usage de nitrites d'alkyles (« poppers »), l'hypothèse d'un agent infectieux transmissible par voie sexuelle et sanguine est admise. Plusieurs cas de transmission hétérosexuelle seront ensuite observés chez des femmes, suivis par des cas de transmission de la mère à l'enfant (Harris et al., 1983; Ragni et al., 1985; Ziegler et al., 1985).

En France, le médecin W. Rozenbaum était simultanément confronté à des cas de SIDA à l'hôpital Bichat de Paris. L'hypothèse d'une étiologie rétrovirale se précisait, tout en sachant que le virus T-lymphotrophique humain (HTLV) représentait alors le seul rétrovirus humain connu à cette période (Barré-Sinoussi, 2010). Par l'intermédiaire de sa collègue F. Brun-Vézinet, W. Rozenbaum avait alors contacté l'équipe de J-L Montagnier (Unité d'Oncologie Virale, Institut Pasteur-CNRS-INSERM) afin de leur envoyer la biopsie ganglionnaire d'un patient atteint d'une lymphadénopathie généralisée. Quelques semaines

après, une activité de transcriptase inverse était effectivement détectée dans le surnageant des cellules ganglionnaires, par F. Barré-Sinoussi dans l'équipe de L. Montagnier, qui recevront conjointement en 2008 le prix Nobel de Médecine (Barré-Sinoussi et al., 1983; Pincock, 2008). Le nouveau rétrovirus isolé et mis en évidence par microscopie électronique avait été appelé virus associé à une lymphadénopathie (LAV), puis séquencé rapidement (Wain-Hobson et al., 1985). Par ailleurs, un test de diagnostic sérologique avait été mis au point et des anticorps avaient été détectés chez plusieurs malades ayant des signes cliniques du SIDA, qui étaient hospitalisés à Paris mais originaires de l'actuelle République Démocratique du Congo (RDC) (Brun-Vezinet et al., 1984a, 1984b). Ce test basé sur la méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* en anglais) sera commercialisé dès 1985.

Aux Etats-Unis, d'autres équipes isolaient à leur tour le virus, en lui attribuant des noms différents. Ainsi, l'équipe de R.C Gallo l'appela HTLV-3, en considérant qu'il correspondait à une nouvelle lignée de HTLV (Gallo et al., 1983). Quant à l'équipe de J.A Levy, elle le nomma virus lié au SIDA (ARV, *Acquired immunodeficiency syndrome Related Virus* en anglais) (Levy et al., 1984). Enfin, en 1986, l'équipe de l'Institut Pasteur de Paris isolait un deuxième type de virus chez deux patients originaires d'Afrique de l'Ouest : il sera appelé LAV-2 (Clavel et al., 1986; Guyader et al., 1987). La même année, le Comité International de la Taxonomie des Virus (CITV) attribue le nom de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à l'agent étiologique du SIDA : LAV-1 et LAV-2 deviennent respectivement VIH-1 et VIH-2 (Coffin et al., 1986).

En Afrique sub-saharienne, les premiers cas de SIDA ont été décrits chez des femmes et des hommes hétérosexuels dès 1984 en République Démocratique du Congo (RDC, anciennement Congo Belge puis Zaïre), au Rwanda puis en Ouganda (Piot et al., 1984; Serwadda et al., 1985; Van de Perre et al., 1984). Ces premiers cas, parmi des patients originaires de RDC, avaient aussi été concurremment rapportés en Belgique, puis en France (Brun-Vezinet et al., 1984b; Clumeck et al., 1984). A la question : « Le SIDA est-il une ancienne maladie originaire d'Afrique ? », trop peu de données scientifiques étaient alors disponibles pour apporter une réponse dès cette période. Toutefois, des séroprévalences VIH positives d'environ 25% étaient observées chez des adultes vivant en Afrique Centrale (Colebunders et al., 1984; Quinn et al., 1986). Après une trentaine d'années de travaux de recherche, l'origine située en Afrique Centrale et la diffusion du virus VIH-1 M, responsable de l'épidémie mondiale, sont désormais clairement établies (D'arc et al., 2015; Faria et al., 2014; Keele et al., 2006).

1.2 Généralités sur le VIH

1.2.1 Taxonomie et structure

Le VIH est un virus du genre *Lentivirus*, qui appartient à la famille des *Retroviridae* (rétrovirus). Le génome des rétrovirus est composé de deux brins d'acide ribonucléique (ARN) monocaténares (polarité positive) et ces virus ont la caractéristique de se répliquer grâce à la reverse transcriptase (RT). La RT est une enzyme polymérase qui traduit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), pour former un ADN double-brin (provirus) capable de s'insérer dans le génome de la cellule hôte. Les rétrovirus sont subdivisés en deux sous-familles et 7 genres suivants : 1) la sous-famille des *Orthoretrovirinae* (genres *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* et *Lentivirus*) ; 2) sous-famille des *Spumaretrovirinae* (genre *Spumaretrovirus*) (**Figure 1**) (Coffin et al., 1997; Tözser, 2010)

Les rétrovirus sont largement répandus parmi les diverses espèces animales, avec une pathogénicité qui diffère en fonction de certains genres. Comme l'indique leur nom, les *Lentivirus* sont des virus provoquant des pathologies d'évolution lente, et ayant également un effet cytopathogène. Aucune pathogénicité n'a encore été mise en évidence pour les *Spumaretrovirus* : ni chez les animaux qu'ils infectent naturellement avec des prévalences élevées, ni chez l'homme qu'ils infectent occasionnellement lors de transmissions zoonotiques du spumavirus simien (SFV) (Rua and Gessain, 2015). Les cinq autres genres de rétrovirus restants sont des oncovirus, qui génèrent généralement soit des leucémies à évolution lente (*Alpharetrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*) soit des sarcomes à évolution rapide (*Betaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*).

Les rétrovirus sont des virus sphériques d'environ 80 à 180 nanomètres (nm) de diamètre. Ils possèdent une enveloppe externe composée d'une bicouche lipidique cellulaire contenant des glycoprotéines d'enveloppes virales. Cette enveloppe, tapissée à l'intérieur par une matrice (MA), entoure la capsid virale (CA) qui contient le génome, la nucléocapside (NC) et les enzymes nécessaires à la répllication virale (**Figure 2**). Les rétrovirus simples (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, et *Epsilonretrovirus*) possèdent les trois gènes de structure *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour les protéines de structure, enzymatique et d'enveloppe (Weiss, 2006). Les *Lentivirus*, avec les *Deltaretrovirus* et les *Spumaretrovirus*, sont des rétrovirus complexes car en plus des gènes de structure, ils possèdent aussi des gènes accessoires et régulateurs. Finalement, les *Lentivirus* regroupent de nombreux

virus qui infectent spécifiquement plusieurs espèces animales comme les primates (VIH, SIV), mais aussi les ovins (VISNA), les équidés (EIAV), les félins (FIV) ou les bovins (BIV : virus de l'immunodéficience bovine) (**Figure 1**).

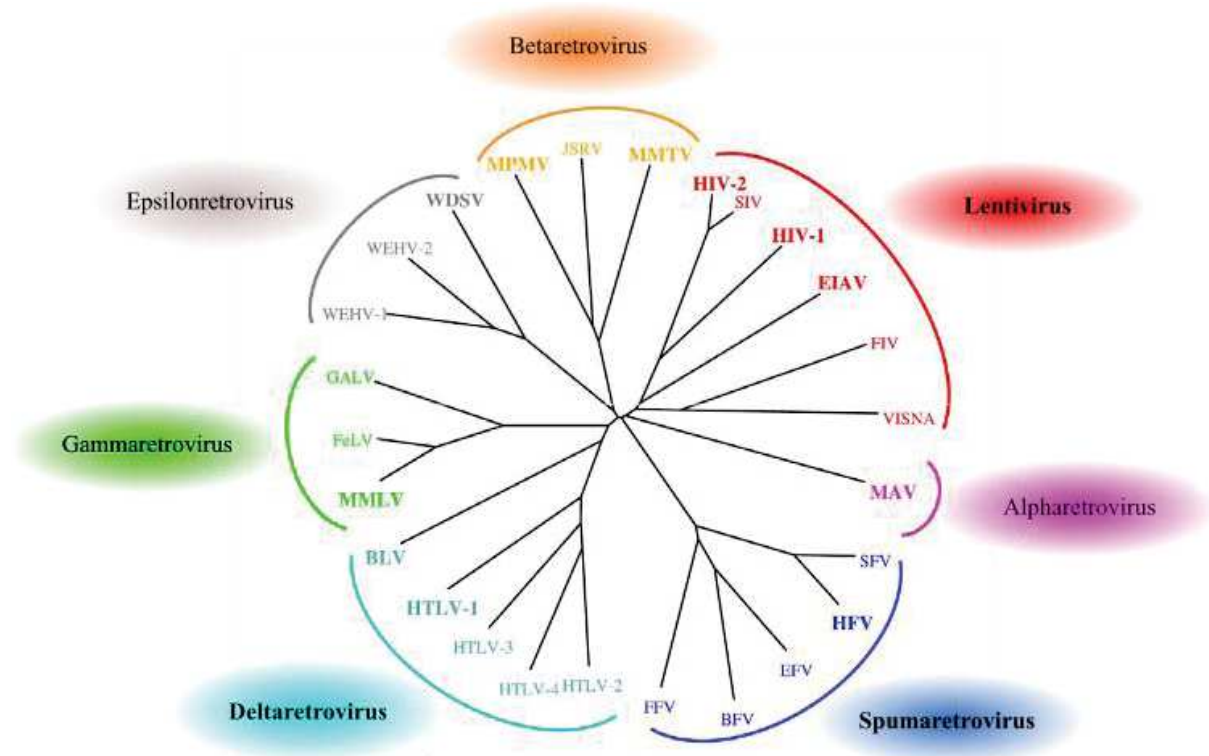


Figure 1. Phylogénie représentant les sept genres de la famille des Retroviridae.

L'arbre a été construit en utilisant les séquences protéiques du gène *protéase* des souches de références représentant chacun des genres : *Alpharetrovirus* (MAV : virus de la myélobastose aviaire), *Betaretrovirus* (MPMV : virus de Mason-Pfizer de singe ; JSRV : rétrovirus Jaagsiekte de mouton ; MMTV : virus de la tumeur mammaire de la souris), *Deltaretrovirus* (HTLV : virus T-lymphotrophique humain ; BLV : virus de la leucémie bovine), *Epsilonretrovirus* (WEHV : virus de l'hyperplasie épidermique du saumon ; WDSV : virus du sarcome dermique du saumon), *Gammaretrovirus* (MMLV : virus de la leucémie murine de Moloney ; FeLV : virus de la leucose féline ; GALV : virus de la leucémie du gibbon), *Lentivirus* (HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; SIV : virus de l'immunodéficience simienne ; EIAV : virus de l'anémie infectieuse des équidés ; FIV : virus de l'immunodéficience féline ; VISNA : virus Maëdi-visna ou lentivirus des ovins), *Spumaretrovirus* (SFV : spumavirus simien ; HFV : spumavirus humain ; EFV : spumavirus équin ; BFV : spumavirus bovin ; FFV : spumavirus félin). Les genres avec des virus complexes sont surlignés en gras (modifiée d'après Tözser, 2010).

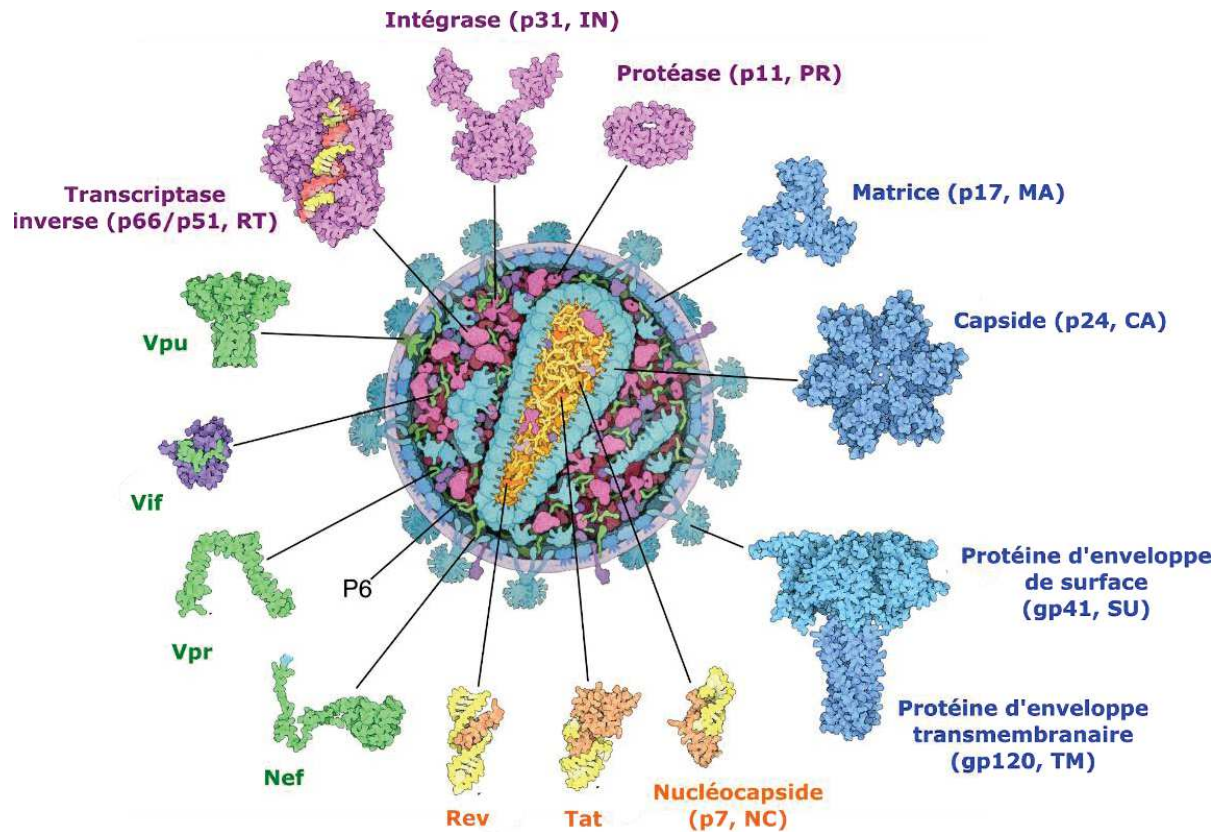


Figure 2. Structure du VIH dessiné à la main à partir des données de biologie structurale, de biophysique et de microscopie.

Le génome ARN du VIH est représenté en jaune pâle. Les protéines structurales sont colorées en bleu, ainsi que les glycoprotéines d'enveloppes. Les protéines enzymatiques sont colorées en violet, avec la transcriptase inverse (RT), qui synthétise l'ADNc (rouge) à partir de l'ARN viral. Les protéines accessoires sont colorées en vert. Enfin, les protéines colorées en orange représentent les protéines encapsidées avec l'ARN viral : les protéines régulatrices Tat et Rev (en orange foncé), ainsi que la protéine de la nucléocapside (en orange pâle) (modifiée d'après Goodsell et al., 2015).

1.2.2 Organisation génétique du VIH

Le génome du VIH mesure environ 10 000 paires de base (pb) et il est composé de 9 cadres ouverts de lectures (**Figure 3**). Dans le sens 5' vers 3', il possède les **trois gènes de structures** communs à tous les rétrovirus: *gag* (pour antigène spécifique de groupe), *pol* (pour polymérase) et *env* (enveloppe). Il possède également **deux gènes régulateurs** (*tat* et *rev*), et **quatre gènes accessoires** (*nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* pour le VIH-1 ou *vpx* pour le VIH-2). Les extrémités du génome du VIH sont flanquées par deux longues séquences terminales répétées (LTR, *Long terminal Repeat* en anglais) (Krebs et al., 2013), d'environ 650 pb. Elles sont identiquement composées des régions uniques en 5' (U5) et 3' (U3), qui encadrent la région

répétée (R). Elles permettent l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Le LTR en 5' sert de promoteur pour la transcription virale tandis que le LTR en 3' sert de signal de fin transcriptionnel. LTR en 3' active aussi la transcription de *nef*.

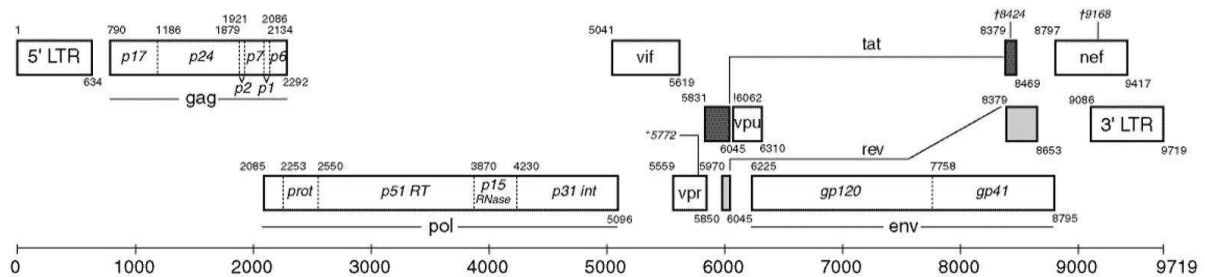


Figure 3. Structure génomique de la souche de référence du VIH-1 (HXB2, numéro d'accèsion GenBank K03455).¹

1.2.2.1 Gènes de structure du VIH : gag, pol et env

Le gène *gag* (environ 1 500 pb) code pour un **précurseur polyprotéique Gag de 55 kDa (Pr55^{Gag})** (Freed, 2015). Les protéines de structures du VIH sont générées grâce au clivage de Pr55^{Gag} par la protéase virale, dans l'ordre des extrémités N-terminale vers C-terminale suivant : **protéine de matrice** (p17, MA), **protéine de capsid** (p24, CA), peptide d'espace SP1, **protéine de nucléocapsid** (p7, NC), peptide d'espace SP2, et **protéine p6** résultante du clivage (**Figure 4**). Ces protéines interviennent dans l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du virus. Brièvement, MA permet l'adressage et la liaison de Pr55^{Gag} à la membrane plasmatique cellulaire où a lieu l'assemblage (Jouvenet et al., 2006), ainsi que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe. CA guide la multimérisation de Pr55^{Gag} au cours de l'assemblage, et elle participe aussi à la formation de la capsid. SP1 et NC interviennent aussi dans l'assemblage de Pr55^{Gag}. De plus, NC participe au recrutement et à l'encapsidation de l'ARN viral. Enfin, p6 recrute le complexe protéique ESRT (*Endosomal sorting complex required for transport*, en anglais) qui catalyse la fission de la membrane cellulaire et permet la libération du virion immature (Carlton and Martin-Serrano, 2007).

¹ <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>, consulté le 03/06/16.

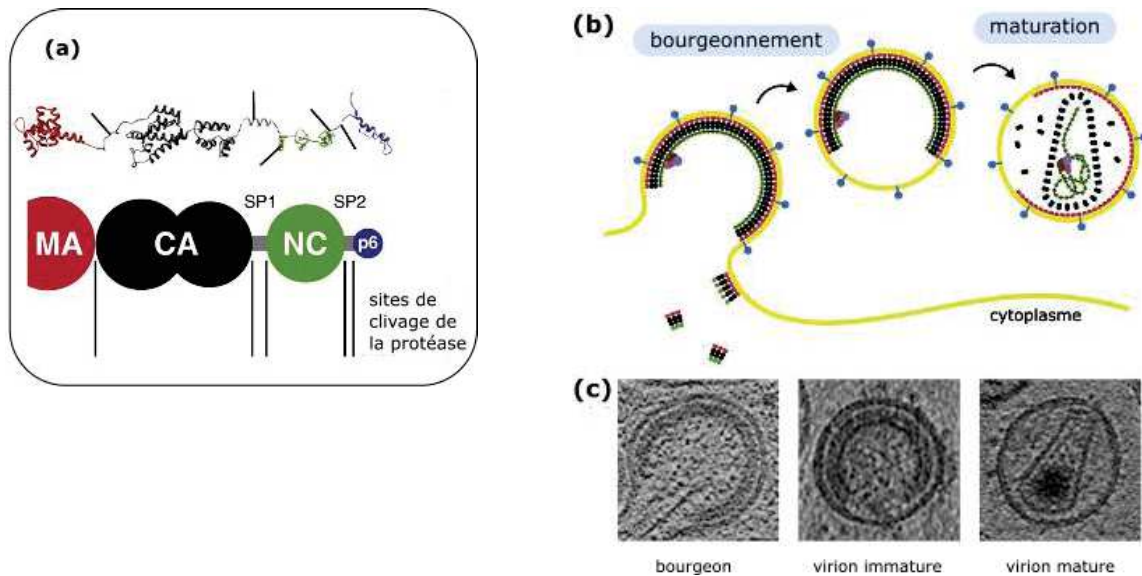


Figure 4. Assemblage et maturation du VIH.

(a) Schéma représentant les principaux domaines de la polyprotéine Pr55^{Gag}, et illustration de son modèle structural. Les positions de clivage par la protéase (trait noir). (b) Schéma de l'assemblage et de la maturation du VIH. Pr55^{Gag} s'assemble au niveau de la membrane plasmique cellulaire pour former un bourgeon. Après scission, le virion immature subit la protéolyse aboutissant à un virus mature. (c) Cryotomographie électronique d'un bourgeonnement du VIH (gauche), d'un virion immature (milieu) et d'une particule virale mature (droite) (modifié d'après Briggs and Kräusslich, 2011).

En association avec le **gène *pol*** (environ 3 000 pb), le gène *gag* peut aussi coder pour le **précurseur polyprotéique Gag-Pol de 160 kDa** (Pr160^{Gag-Pol}) (Freed, 2015). Le clivage de Pr160^{Gag-Pol} par la protéase (N-terminale vers C-terminale), génère Pr55^{Gag} ainsi que les trois protéines enzymatiques du VIH : **protéase** (p11, PR), **rétro-transcriptase** (p66/p51, RT), **intégrase** (p32, IN). Brièvement, PR permet le clivage de Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} au cours de la maturation du virus. L'inactivité de la protéase conduit à la production de particules virales immatures non infectieuses. RT converti l'ARN viral monocaténaire en ADN bicaténaire après son entrée dans la cellule. IN permet l'insertion de l'ADN néo-synthétisé dans le génome de la cellule hôte.

Le **gène *env*** (environ 2 500 pb) code pour le **précurseur glycoprotéique 160** (gp160). La gp160 est ensuite clivée par une protéase cellulaire en une **glycoprotéine de surface 120** (gp120, SU) et en une **glycoprotéine transmembranaire 41** (gp41, TM). La gp120, composée de 5 régions conservées (C1-C5) et 5 domaines hypervariables (V1-V5), qui forment des boucles à leur base et contiennent les sites de liaison pour le récepteur CD4 et co-récepteurs des chémokines (CCR5 ou CXCR4) (Wilén et al., 2012). Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont donc impliquées dans l'attachement, la fusion et la cytolysse au cours de l'entrée du virus dans la cellule.

1.2.2.2 Gènes régulateurs et accessoires du VIH

Les gènes régulateurs *tat* et *rev* codent respectivement pour la protéine trans-activatrice (Tat) et la protéine régulatrice de l'expression du VIH (Rev) (Adamson and Freed, 2010; Goodsell, 2012). A l'intérieur de la capsid, Tat active l'élongation en se liant à la région TAR (*Transactivation response region*, en anglais) de l'ARNm (Karn and Graeble, 1992). Rev joue un rôle majeur dans le transport de l'ARNm viral du noyau vers le cytoplasme et il régule négativement l'expression de *Tat*, *Rev* et *Nef*.

Les gènes accessoires ne sont pas essentiels à la réplication virale, contrairement aux gènes régulateurs. Les gènes *vif*, *vpr*, *vpu* (ou *vpx* pour le VIH-2) et *nef* codent respectivement pour le facteur d'infectivité virale (Vif), les protéines virales R (Vpr) ou X (Vpx, pour le VIH-2) et U (Vpu), ainsi que le facteur négatif (Nef). Brièvement, dans le cytoplasme, Vif augmente significativement l'infectivité du virus, tandis que Vpr facilite notamment l'import du complexe de pré-intégration (CPI) viral du cytoplasme de la cellule hôte vers le noyau. Dans l'enveloppe, Nef augmente notamment la réplication et la pathogénicité du virus, tandis que Vpu (ou Vpx pour le VIH-2) active le relargage des virions immatures et induit la dégradation des CD4.

1.2.3 Cycle de réplication virale

Les principales cellules cibles du VIH sont celles qui présentent à leur surface la glycoprotéine CD4 : les lymphocytes T CD4⁺ (CD4) majoritairement, mais aussi les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, ainsi que les cellules de la microglie cérébrale (Dalglish et al., 1984). La réplication a donc lieu dans les organes lymphoïdes, principalement les ganglions lymphatiques, mais aussi dans l'intestin au niveau du GALT (tissu lymphoïde associé au tube digestif, *gut associated lymphoid tissue* en anglais), dans la rate et le thymus, ainsi qu'au niveau du cerveau. Elle a également lieu dans les liquides biologiques (sang, sécrétions génitales, lait, liquide broncho-alvéolaire...).

Le cycle de réplication du VIH débute par la phase précoce, qui comprend : l'entrée du virus dans la cellule cible, puis la transcription de l'ARN viral génomique en ADN, en vue d'être intégré dans le génome de la cellule cible (**Figure 5**). Ensuite, la phase tardive est dépendante de l'état d'activation de la cellule infectée. Tandis que les cellules en état de latence représentent les réservoirs cellulaires de l'infection, les cellules infectées réaliseront : la transcription de l'ADN proviral, la traduction des protéines virales, l'assemblage, le

bourgeoisement et enfin, la maturation du virus. De cette façon, environ 10^9 à 10^{10} virus sont produits chaque jour chez une personne infectée non traitée (Geretti, 2006). Le cycle répliatif du VIH *in vivo* dure en moyenne 1,2 jour et le temps de génération d'un nouveau virion est de 2,6 jours. Les cellules productives infectées ont une demi-vie de 2,2 jours et les particules virales dans le plasma ont une durée de vie moyenne de 0,3 jours (Perelson et al., 1996).

Les molécules antirétrovirales actuellement disponibles bloquent une des différentes étapes du cycle de répliation du virus : entrée, transcription inverse, intégration ou la maturation. Elles sont présentées **en partie 2** de ce chapitre.

1.2.3.1 Phase précoce

Pour entrer dans la cellule hôte, la gp120 (au niveau de sa boucle V1) du VIH doit d'abord reconnaître spécifiquement le récepteur CD4 des lymphocytes T CD4+ activés (**Figure 5**) (Wilén et al., 2012). Grâce à cette liaison de haute affinité, la gp120 va subir un changement conformationnel qui va lui permettre de se lier (au niveau de sa boucle V3) à l'un des deux co-récepteurs aux chimiokines, CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*, en anglais) ou CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*, en anglais) (Feng et al., 1996). Cette nouvelle liaison engendre également un changement conformationnel de la gp41 du VIH, qui lui permet d'entrer en contact avec la membrane cellulaire et de réaliser la fusion de l'enveloppe virale avec celle des lymphocytes T CD4.

Dans le cytoplasme, la transcription inverse a lieu simultanément avec la décapsidation du virus. Elle est réalisée grâce aux trois activités enzymatiques distinctes que possède la RT : 1) polymérisation d'ADNc à partir de l'ARN viral pour former un hybride ARN/ADNc, 2) dégradation de l'ARN viral par la ribonucléase H (RNase H), et 3) polymérisation d'ADN à partir de l'ADN viral néo-synthétisé pour former un double brin d'ADN viral (Telesnitsky and Goff, 1997). Le double brin d'ADN viral va ensuite former le complexe nucléoprotéique CPI, qui sera transféré activement vers le noyau, notamment grâce à Vpr (Bowerman et al., 1989). L'intégration de l'ADN proviral sera alors réalisée par l'intégrase (IN), qui clivera d'abord les extrémités 3'-LTRs de l'ADN, puis insérera de façon stable l'ADN viral en ligant ces LTRs au génome cellulaire (Craigie, 2012). Cette étape étant complexe, dans un certain nombre de cas, l'ADN reste sous forme non intégrée : soit linéaire où il se dégrade, soit sous forme circulaire avec un ou deux LTRs (**Figure 5**). Une fois intégré, le provirus peut rester latent pendant de longues périodes, constituant ce qu'on appelle des « réservoirs ». Les lymphocytes T CD4+ au repos (CD4 mémoires) représentent les principales cellules réservoirs du VIH.

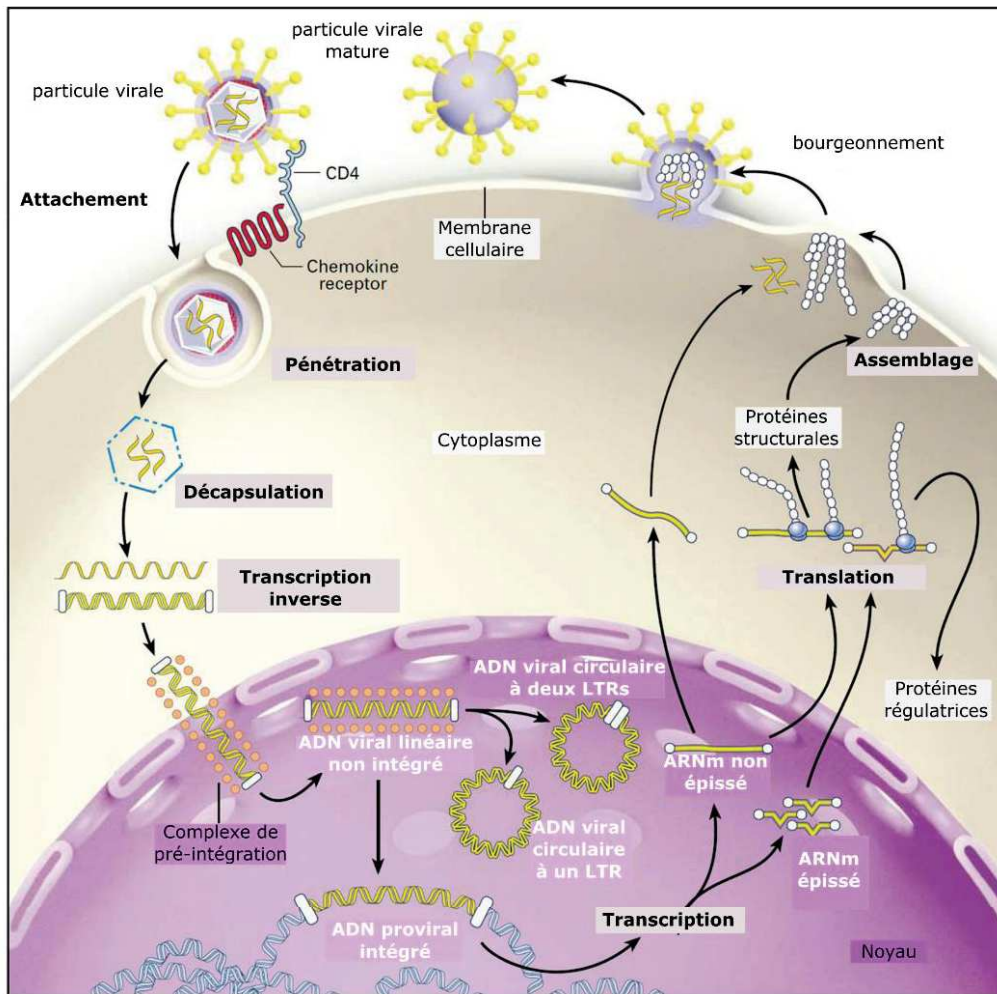


Figure 5. Schéma des étapes du cycle de réplication viral montrant les différentes formes d'acides nucléiques du VIH présents dans la cellule infectée.

Une fois entré dans le cytoplasme, l'ARN génomique est rétro-transcrit en ADN double-brins qui va entrer dans le noyau sous forme de complexe de pré-intégration. Dans le noyau, l'ADN non intégré se trouve sous forme linéaire et circulaire possédant un ou deux LTRs. L'ADN linéaire non intégré est précurseur de l'ADN proviral intégré, qui est une structure stable qui reste dans le génome de la cellule infectée afin de servir comme modèle transcriptionnel. A l'issue de cette transcription et d'un épissage alternatif, on retrouve dans le noyau de l'ARN transcrit (ARNm) sous forme épissée (codant pour les protéines régulatrices Tat, Rev et Nef) et sous forme non épissée (codant pour les protéines structurales comprenant la protéine précurseur Gag-Pol) (modifié de Pasternak et al., 2013).

Au cours de cette phase précoce du cycle du VIH, trois facteurs de restriction cellulaire peuvent limiter la réplication du VIH : (1) TRIM5alpha, qui module la décapsidation du virus ; (2) APOBEC3G, qui provoque des hypermutations au cours de la transcription inverse, aboutissant soit à la dégradation de l'ADN viral, soit à la production de protéines virales non fonctionnelles ; (3) SAMHD1, qui inhibe aussi l'étape de reverse transcription (Laguette et al., 2011; Sheehy et al., 2002; Stremlau et al., 2004). Cependant, les protéines virales Vif et Vpx contrecarrent respectivement l'activité d'APOBEC3G et de SAMHD1.

1.2.3.2 Phase tardive

De façon simple, le provirus utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer : l'ADN proviral est transcrit en ARN par la polymérase II cellulaire, sous l'action activatrice de Tat. A l'issue d'un épissage alternatif, l'ARNm est transporté du noyau vers le cytoplasme, grâce à Rev. A partir de l'ARN épissé, les protéines régulatrices Tat et Rev sont les premières à être traduites, car elles jouent un rôle essentiel dans la transcription et la traduction des précurseurs polyprotéiques Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} (à partir de l'ARN non épissé), des glycoprotéines d'enveloppes et des protéines accessoires. Comme cela a déjà été brièvement décrit (partie 1.2.2.1), Pr55^{Gag} s'assemble au niveau de la membrane plasmique cellulaire pour former un bourgeon. Après scission, le virion immature est libéré dans le milieu extracellulaire et subit la protéolyse, qui aboutit à la formation d'un virus mature (**Figures 4 et 5**). La Tetherine est un facteur de restriction cellulaire pouvant inhiber le bourgeonnement des nouvelles particules virales, mais elle est elle-même inhibée par Vpu pour le VIH-1 M et par Nef pour le VIH-1 O (Kluge et al., 2014; Neil et al., 2008; Sauter et al., 2009; Van Damme et al., 2008).

1.2.3.3 Origine de la diversité génétique et recombinaisons du VIH

La RT est une enzyme peu fidèle car elle est dépourvue de l'activité exonucléasique 3'-5', qui permet de corriger les erreurs de transcription (Roberts et al., 1988). Ainsi, on estime que l'activité de la RT induit un taux de mutation de 3,4 à 10×10^{-5} mutations par paire de base (pb) et par cycle de réplication. La taille du génome étant d'environ 10^4 pb, on estime finalement que le taux de mutations varie entre 0,34 et 1 mutation par génome et par cycle de réplication (Geretti, 2006). Les insertions et les délétions au sein du génome viral sont également fréquentes. De plus, le VIH possède un taux de réplication virale élevé : environ 10^9 à 10^{10} de virus sont produits chaque jour chez une personne infectée non traitée (Geretti, 2006).

L'association de ces deux facteurs, erreur de transcription et réplication élevée, génère rapidement de nombreux variants minoritaires, qui sont génétiquement différents tout en restant extrêmement proches. Egalement appelés « quasi-espèces », ils sont à l'origine d'une variabilité génétique intra-individuelle (Hemelaar, 2012). Ainsi, on estime que les séquences nucléotidiques virales peuvent différer jusqu'à 10% au sein d'un même individu. Cette caractéristique enzymatique contribue fortement à la diversité génétique du VIH et à l'émergence des résistances, en présence d'une pression de sélection immunitaire et antirétrovirale.

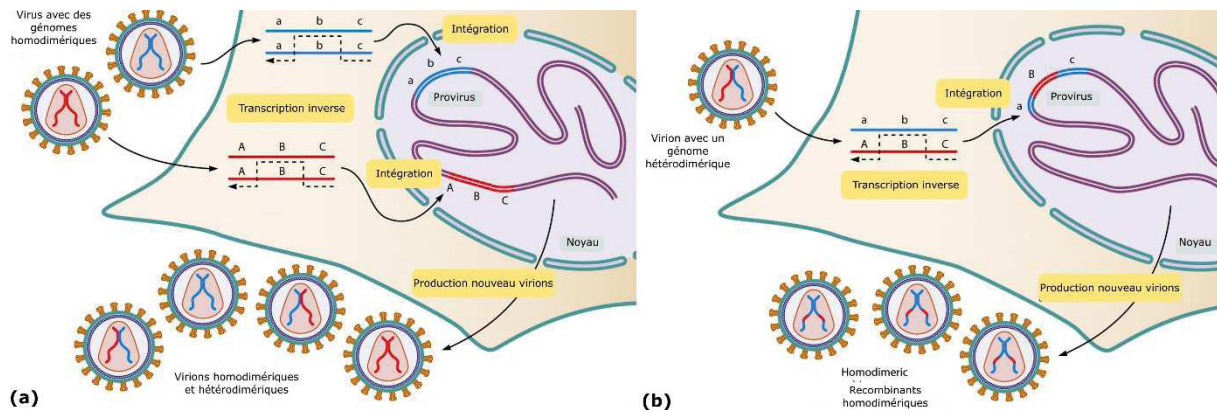


Figure 6. Mécanisme de formation d'un virus recombinant :

(a) Une co-infection avec deux souches génétiquement différentes n'est pas suffisante pour produire des virus recombinants. La cellule cible doit être infectée par les deux souches homozygotes, dont le génome est coloré en **bleu** pour l'une et en **rouge** pour l'autre, afin de produire un nouveau virus avec un génome hétérozygote. (b) La recombinaison est observable dans les cellules infectées par un virus hétérozygote. Pour cela, il est nécessaire que la RT fasse un changement de matrice, qui sera à l'origine d'un provirus recombinant (modifié d'après Onafuwana-Nuga and Telesnitsky, 2009).

Au cours de la transcription inverse, la RT change aussi fréquemment de matrice. En cas de co-infection, ou plus souvent de superinfection (ré-infection), par au moins deux souches virales génétiquement différentes, il est possible que cela génère des virus recombinants qui sont obtenus après deux cycles de recombinaison successifs (**Figure 6**). La recombinaison est un processus au cours duquel le virion néoformé possède un matériel génétique issu de l'échange de matériel de deux virus parentaux. Ce mécanisme peut concerner des sous-types ou des groupes différents (M et O par exemple), et même des virus déjà recombinants (Robertson et al., 1995).

1.2.4 L'histoire naturelle de l'infection à VIH/SIDA

Le VIH se transmet de façon horizontale par voie sexuelle (sperme, sécrétions vaginales) et sanguine (ex. transfusion ou partage de seringues contaminées) ; et de façon verticale de la mère à l'enfant, au cours de la grossesse, l'accouchement ou de l'allaitement. Schématiquement, plus la charge virale est élevée dans le liquide contaminant, plus le risque de transmission est important. Inversement, l'indétectabilité du virus réduit fortement sa transmission, sans l'empêcher complètement.

1.2.4.1 Phase de primo-infection

La phase de primo-infection correspond aux premières semaines qui suivent l'entrée du virus dans l'organisme (**Figure 7**). Dans les cas les plus communs de transmission sexuelle, le VIH traverse l'épithélium de la muqueuse génitale ou rectale en quelques heures. De façon paradoxale, la mise en place de la réponse immunitaire va fournir au virus les cellules cibles lui permettant sa réplication au niveau local. Ainsi, le VIH va se multiplier intensivement dans les lymphocytes T CD4+ activés qui affluent, produisant environ 10^9 à 10^{10} virus par jour, et détruisant une quantité à peu près équivalente de lymphocytes T CD4. Cette déplétion massive et précoce en lymphocytes T CD4+ concerne surtout les compartiments muqueux, et principalement le GALT de la muqueuse intestinale. Pendant cette phase qui est dite « d'éclipse » et qui dure une dizaine de jours, la charge virale (CV) plasmatique est indétectable (Coffin and Swanstrom, 2013).

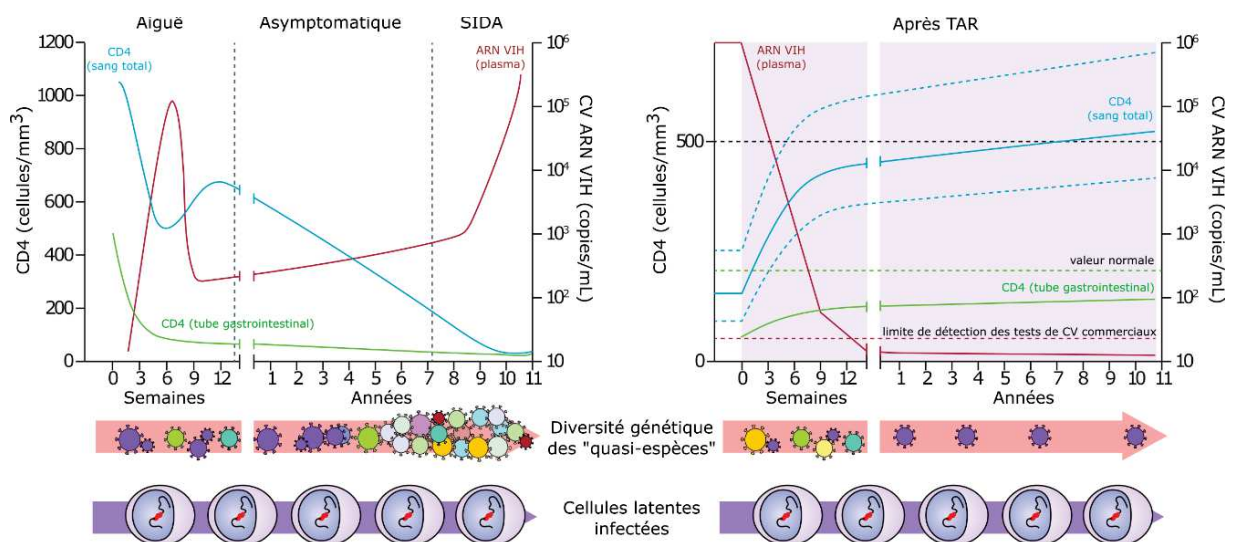


Figure 7. Evolution de la charge virale (CV) ARN du VIH et du nombre de CD4 pendant l'infection à VIH et après la mise sous traitement antirétroviral (TAR).

En l'absence de TAR, plus la CV est élevée, plus la destruction lymphocytaire est intense et plus le passage du stade asymptomatique vers le stade SIDA sera rapide. Inversement, en présence de TAR, plus la CV est faible, meilleure est la reconstitution immunitaire, moindres sont les risques de résistance et de progression vers la maladie et donc, plus longue est l'espérance de vie. La mesure de la CV plasmatique permet d'estimer la progression de la maladie et constitue actuellement le marqueur le plus précoce et le plus prédictif d'une évolution clinique défavorable (modifié d'après Maartens et al., 2014).

Deux à 6 semaines après la contamination, le virus va migrer vers les ganglions lymphatiques, puis disséminer vers les organes lymphoïdes. Cela se traduit par une augmentation très rapide de la CV plasmatique, pouvant aller jusqu'à 10^7 copies/mL, et une diminution transitoire des lymphocytes T CD4⁺ sanguins. A ce moment, la présence de l'antigène viral p24 est détectable avec un test ELISA de quatrième génération, avant que les anticorps soient déjà présents. Cette phase dite « aiguë » de l'infection, s'accompagne dans 50 à 60% des cas de manifestations cliniques non spécifiques, correspondant généralement à un syndrome pseudo-grippal. A la fin de cette phase, du fait de la mise en place de la réponse immune cellulaire et de l'épuisement des cellules cibles activées, on observe une chute considérable de la virémie ($< 1\ 000$ copies/mL) et inversement, le taux de lymphocytes T CD4⁺ augmente.

Les réservoirs viraux sont constitués dès la primo-infection, avec l'intégration du virus dans le génome des cellules hôtes. Cette phase instaure aussi une activation immunitaire ou inflammation chronique associée au VIH dont les effets délétères pour de nombreux organes (cœur, os, vaisseaux, reins) sont à l'origine de différentes co-morbidités liées au VIH.

1.2.4.2 Phase de latence clinique ou asymptomatique

Environ 12 semaines après l'infection, la mise en place de la réponse immune cellulaire provoque l'entrée dans la phase de latence clinique, souvent asymptomatique et pouvant durer entre 2 et 12 ans. Les anticorps anti-VIH apparaissent généralement dans la circulation sanguine entre la 3^{ème} semaine et la 12^{ème} semaine après l'infection. Pendant cette phase, la réplication virale est inhibée par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CD8) qui détruisent les cellules cibles infectées, et les anticorps anti-VIH qui limitent la fixation du VIH aux CD4. Cette phase est caractérisée par une augmentation constante ou légèrement progressive de la CV plasmatique, généralement de $< 1\ 000$ à $> 100\ 000$ copies/mL. (Coffin and Swanstrom, 2013). La valeur de CD4 initialement stable, voire proche de la normale (~ 1000 cellules/mm³) va progressivement diminuer (environ 50-100 cellules/mm³ par an). Ils sont continuellement renouvelés jusqu'à l'altération des organes lymphoïdes, rompant ainsi l'équilibre précaire qui s'était créé entre la réplication virale et la réponse immunitaire.

1.2.4.3 Phase symptomatique aboutissant au SIDA

Ce stade correspond à l'augmentation de la CV plasmatique et à l'effondrement du système immunitaire ($CD4 < 200$ cellules/mm³). L'infection symptomatique est caractérisée par des maladies opportunistes mineures (candidose orale) ou majeures (pneumocystose, toxoplasmose, tuberculose, CMV...). Elle peut aussi entraîner des maladies tumorales (sarcome de Kaposi lié à HHV-8, lymphome B lié à EBV), ainsi que des encéphalopathies à VIH. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a élaboré une classification clinique en 4 stades de l'infection à VIH (stade 1 pour asymptomatique, puis stades 2, 3 et 4 en fonction de la gravité des maladies). En l'absence de traitement antirétroviral (TAR), l'évolution naturelle de l'infection à VIH aboutit au décès de quasiment tous les patients, en moyenne 8 à 10 ans après la primo-infection. Occasionnellement (< 1%), certains patients appelés « contrôleurs du VIH » (*elite controllers* en anglais) arrivent à contrôler l'infection en l'absence de TAR sur une très longue période : ils contrôlent naturellement la réplication du virus et maintiennent un niveau de CD4 élevé (Cao et al., 1995; Lambotte et al., 2005).

1.3 Origine et diversité génétique du VIH

1.3.1 « Au bon endroit, au bon moment » : origine et diffusion du VIH-1 M

Au début du 20^{ème} siècle, un chimpanzé de l'espèce *Pan troglodytes troglodytes*, qui vivait dans la forêt de la Lobéké au Sud-Est du Cameroun, a transmis le virus de l'immunodéficience simienne (SIVcpz-Ptt) à l'Homme (Faria et al., 2014; Gao et al., 1999; Keele et al., 2006; Van Heuverswyn et al., 2007; Wertheim et Worobey, 2009). Dans cette région où les primates non-humains (PNH) sont chassés et consommés comme viande de brousse, cette femme ou cet homme a probablement été infecté en se blessant au cours de la chasse ou du dépeçage de l'animal (Locatelli et Peeters, 2012). Toutefois, l'épicentre de l'épidémie du VIH-1 M ne se situe pas à cet endroit, mais à 1 000 km plus loin, à Kinshasa, la capitale de l'actuelle RDC. En effet, les analyses phylogénétiques ont montré que la plus grande diversité des souches de VIH-1 M circule en RDC, puis dans les pays du bassin du fleuve Congo, comme le Cameroun, le Gabon et la République du Congo (RC) (Carr et al., 2010; Kalish et al., 2004; Niama et al., 2006; Pandrea et al., 2002; Pepin, 2011; Vidal et al., 2000).

De plus, les deux plus anciennes séquences de VIH-1 M proviennent d'un plasma (ZR59, sous-type D) et d'une biopsie ganglionnaire (DRC60, sous-type A), datant respectivement de 1959 et 1960, prélevés chez deux patients à Léopoldville (actuelle Kinshasa), capitale du Congo Belge (actuelle RDC) (Worobey et al., 2008; Zhu et al., 1998).

Le VIH-1 M serait donc arrivé Sud du Cameroun à Kinshasa, à travers la rivière Sangha et le fleuve Congo qui à l'époque, était une voie de transport fluvial très utilisée pour le commerce, notamment de caoutchouc et d'ivoire (Faria et al., 2014; Sharp et Hahn, 2008; de Sousa et al., 2012). Entré vers 1920 (1909-1930) à Kinshasa, le VIH-1 M est ensuite arrivé dans les villes de Brazzaville, Mbuji-Mayi puis Lubumbashi, en une vingtaine d'années (**Figure 8**). Mbuji-Mayi est la ville où circulait probablement l'ancêtre commun du VIH-1 M sous-type C, qui représente actuellement environ 50% des infections à VIH dans le monde (Faria et al., 2014; Hemelaar et al., 2011). L'urbanisation et l'augmentation de la mobilité des populations à travers les voies de transport ferroviaire ont joué un rôle fondamental dans la dissémination rapide du virus. Ensuite, des facteurs sociaux, comme le déséquilibre entre hommes et femmes (ratio 10/1 à 5/1), ainsi que les prévalences élevées d'infections sexuellement transmissibles (IST) et l'usage de matériel médical non stérilisé, ont aussi contribué à la propagation de l'épidémie, notamment après 1960 où une seconde phase d'expansion très rapide du VIH-1 M a été observée.

L'ancêtre commun du VIH-1 M sous-type B (VIH-1 B), qui prédomine dans les pays développés, circulait à Kinshasa vers 1944 (1962-1970). Cette souche a été importée en Haïti vers 1964 (1960-1967) par des haïtiens revenant de RDC, où ils étaient nombreux à être partis travailler après son indépendance en 1960 (Gilbert et al., 2007; Pepin, 2011). Enfin, elle serait arrivée vers 1970 aux Etats-Unis, probablement à New-York, puis à San Francisco vers 1975, soit quelques années avant la description des premiers cas à Los Angeles en 1981 (Cohen, 2016; Gottlieb et al., 1981; Worobey et al., 2016). Le VIH-1 B a ensuite diffusé en Océanie, en Asie, en Europe, en Amérique Latine et aux Caraïbes, et en Australie (**Figure 8**); et il représente actuellement environ 10% des infections à VIH dans le monde (Hemelaar et al., 2011; Junqueira et Almeida, 2016).

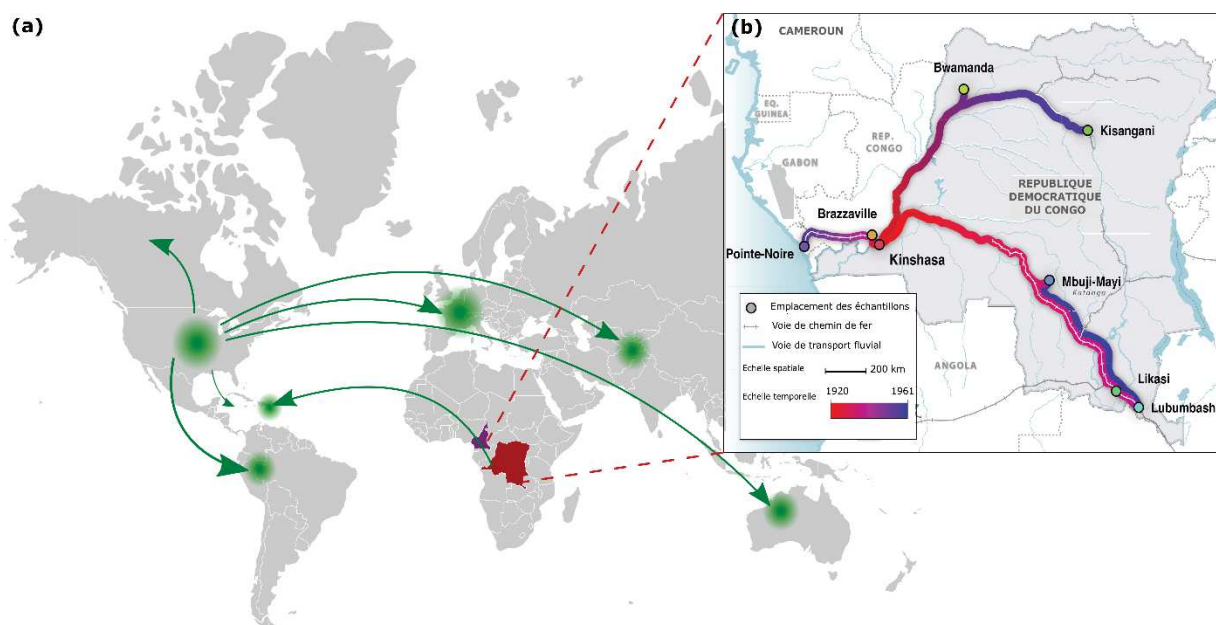


Figure 8. Dynamique spatiale VIH-1 M sous-type B à travers le monde.

(a) Les flèches **vertes** représentent les principales voies de diffusion du VIH-1 B. L'origine du VIH-1 M provient d'une transmission zoonotique qui est survenue en Afrique, au Cameroun (**violet**). L'épidémie a ensuite débuté à Kinshasa, en RDC (**rouge**) (modifié d'après Junqueira et Almeida, 2016). (b) **Dynamique spatiale du VIH-1 à travers la RDC, entre 1920 et 1960.** Entré vers 1920 à Kinshasa, le virus est arrivé vers 1937 dans la ville à proximité de Brazzaville, mais aussi dans celles beaucoup plus éloignées de Lubumbashi et Mbuji-Mayi, grâce à la voie de chemin de fer. A travers le fleuve Congo, le virus est ensuite aussi arrivé à Bwamanda vers 1946, et Kisangani vers 1953 (modifié d'après Faria et al., 2014).

1.3.2 Origine zoonotique du VIH et risque d'émergence

A ce jour, treize transmissions zoonotiques, correspondant à un événement unique et impliquant trois espèces différentes de primates non-humains (PNH), ont été documentées : 4 pour le VIH-1 (correspondant aux groupes M, N, O et P), et 9 pour le VIH-2 (correspondant aux groupes A-I). Comme pour le groupe M, le VIH-1 N provient de la transmission d'un SIVcpz-*Ptt* ayant infecté un chimpanzé vivant au Sud du Cameroun mais par contre, celle-ci serait survenue plus récemment, vers 1963 (1948-1977) (Keele et al., 2006; Van Heuverswyn et al., 2007; Wertheim et Worobey, 2009). Quant aux VIH-1 groupes O et P, ils proviennent de la transmission de SIVs ayant infecté des gorilles de l'espèce *Gorilla gorilla gorilla* (SIVgor) vivant au Cameroun (D'arc et al., 2015; Neel et al., 2010; Van Heuverswyn et al., 2006).

L'ancêtre simien direct du VIH-1 O n'a pas encore été identifié, mais un SIVgor présentant près de 70% d'homologie avec tout le génome du VIH-1 O a récemment été décrit, chez un gorille qui vivait au Sud du Cameroun (D'arc et al., 2015). La plus ancienne séquence de VIH-1 O provient d'un plasma datant de 1971, prélevé chez un marin norvégien infecté au Cameroun, vers 1960 (Jonassen et al., 1997). Les analyses d'horloge moléculaire ont montré que la date de transmission zoonotique à l'origine du VIH-1 O serait proche de celle du VIH-1 M, et qu'elle daterait de 1920 (1890-1940). Jusqu'en 1960, la diffusion de ces deux virus semble similaire (Faria et al., 2014). Ensuite, l'expansion du VIH-1 O serait restée stable et confinée autour du Cameroun, contrairement au VIH-1 M.

L'ancêtre simien direct du VIH-1 P vient d'être clairement identifié chez des groupes de gorilles vivant au Sud-Ouest du Cameroun (D'arc et al., 2015). La date de transmission reste incertaine, entre 1845 et 1989, comme seulement deux patients infectés par le VIH-1 P ont actuellement été documentés (Plantier et al., 2009; Vallari et al., 2011).

Enfin, les VIH-2 proviennent de neuf transmissions (correspondant aux groupes A-I) de SIVsmm infectant des petits singes de l'espèce mangabés enfumés (*Cercocebus atys* en latin, *Sooty mangabey* en anglais) vivant en Afrique de l'Ouest : dans la forêt de Taï en Côte d'Ivoire (A,B,C,G,H et I), au Liberia (D) et en Sierra-Léone (E et F) (Ayoub et al., 2013; Damond et al., 2004; Hirsch et al., 1989). Ces transmissions seraient survenues plutôt vers le milieu du 20^{ème} siècle pour les deux principaux groupes de VIH-2 (A et B), les autres groupes étant documentés généralement chez une seule personne (Faria et al., 2012; Lemey et al., 2003; Visseaux et al., 2016b; Wertheim et Worobey, 2009). Le fait que le mangabé enfumé soit une espèce fréquemment chassée ou utilisée comme animal de compagnie en Afrique de l'Ouest, expliquent pourquoi de nouvelles transmissions continuent à être décrites (Ayoub et al., 2013).

Compte-tenu de l'augmentation persistante des contacts entre l'Homme et les PNHs vivant en Afrique de l'Ouest et Centrale, la possibilité d'une nouvelle transmission zoonotique du SIV menant à l'émergence d'un nouveau VIH est toujours d'actualité (Locatelli et Peeters, 2012).

1.3.3 Classification du VIH

La base de la classification du VIH repose d'abord sur la diversité génétique liée à ses différentes origines simiennes (SIVgor/SIVcpz et SIVsmm), comme nous venons de l'évoquer. Il est ainsi constitué de deux types de virus : le VIH-1 et le VIH-2.

1.3.3.1 VIH-1 : 4 groupes (M,N,O et P), 9 sous-types (A-K) et presque 80 CRFs

Le VIH-1 est divisé en 4 groupes : M pour « Majeur », N pour « non-M/non-O », O pour « Outlier », et P (**Figure 9**) (Barré-Sinoussi et al., 1983; De Leys et al., 1990; Plantier et al., 2009; Robertson et al., 2000; Simon et al., 1998).

Au sein de l'hôte, les taux élevés de mutations et de recombinaisons sont aussi à l'origine de la diversité génétique du VIH, qui est soumise à la pressions de sélection de la réponse immunitaire et de plus en plus aujourd'hui à celle du traitement antirétroviral (TAR) (**paragraphe 1.2.3.3**). De cette façon, les séquences du VIH-1 M se sont diversifiées au cours de l'évolution de l'épidémie (Rambaut et al., 2001). Actuellement, le VIH-1 M est divisé en neuf sous-types (A-D, F-H, J et K) ainsi qu'en sous-sous-types pour le VIH-1 A (A1-A4) et le VIH-1 F (F1 et F2) (**Figure 9**). Les sous-types E et I correspondent désormais à des virus recombinants, appelés respectivement CRF01_AE et CRF04_cpx. La divergence des séquences nucléotidiques entre les sous-types varie entre 17 et 35% en fonction des sous-types et des régions génomiques analysées (Hemelaar, 2012). Par exemple, la région *env* possède la plus grande variabilité génétique.

Par ailleurs, on observe de plus en plus de recombinaisons entre les sous-types (Lau et Wong, 2013). Lorsqu'elles se restreignent à quelques individus, ce sont des formes recombinantes uniques (URF, *unique recombinant form* en anglais). Lorsqu'elles diffusent dans la population et sont documentées chez au moins trois patients n'ayant aucun lien épidémiologique, ce sont des formes recombinantes circulantes (CRF, *circulating recombinant form* en anglais). Actuellement, presque 80 CRFs ont été identifiés dans le monde². Leur dénomination se fait en indiquant d'abord le numéro correspondant à l'ordre dans lequel ils ont été décrits, puis les deux lettres correspondantes aux sous-types ayant recombiné. Par exemple, CRF02_AG indique une recombinaison entre les sous-types A et G, et c'est le deuxième recombinant décrit. Les CRFs sont de plus en plus complexes car ils peuvent aussi recombiner,

² <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF78>, consulté le 03/06/16

engendrant ainsi des CRFs de 2^{ème} génération. On utilise alors le numéro du CRF de 1^{ère} génération pour les dénommer. Par exemple, CRF22_01A1 indique une recombinaison entre le CRF01_AE et le sous-sous-type A1, et c'est le vingt-deuxième recombinant décrit.

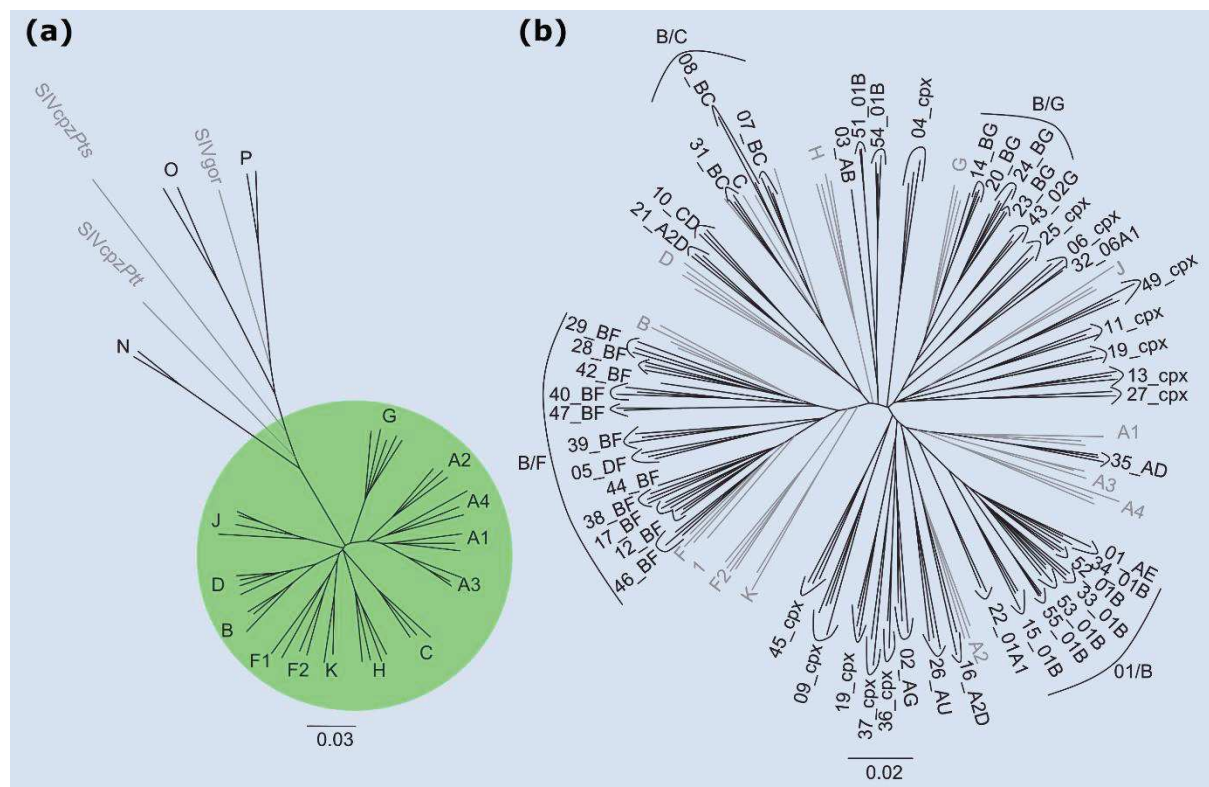


Figure 9. Phylogénie représentant la large diversité des souches issues de la lignée VIH-1/SIVcpz/SIVgor.

(a) Phylogénie représentant les quatre groupes de VIH-1 M, N, O et P (en noir), ainsi que les SIVs infectant les chimpanzés (SIVcpz-Ptt, SIVcpz-Pts) et les gorilles (SIVgor) (en gris). Le VIH-1 M divisé en sous-types (A-D, F-H, et J-K) et sous-sous-types (A1-A4, F1-F2) est coloré en vert. (b) Phylogénie représentant la diversité des sous-types de VIH-1 M (en gris) et des CRFs (en noir). Ces deux arbres ont été construits avec les génomes complets des souches de références représentant les VIH-1 et SIVs (méthode Neighbor-Joining). Les barres d'échelle indiquent les pourcentages de divergence. CRFs : formes recombinantes circulantes (modifié d'après Peeters et al., 2013).

1.3.3.2 VIH-2 : 9 groupes (A-I)

Le VIH-2 est composé de neuf groupes : A, B, C, D, E, F, G, H et I (Ayouba et al., 2013; Damond et al., 2004). Le VIH-2 circule principalement dans les pays d'Afrique de l'Ouest où entre 1 et 2 millions de patients étaient infectés dans les années 1990 (Visseaux et al., 2016b). L'épidémie est représentée par le groupe A (Guinée-Bissau et Sénégal) et le groupe B (Côte d'Ivoire). Chacun des autres groupes a été identifié seulement chez un patient, excepté le groupe F chez deux patients. Mis à part les groupes G et H décrits chez deux patients vivant à Abidjan

(capitale économique de la Côte d'Ivoire), les autres groupes (C à I) ont été documentés uniquement chez des individus vivant en zone rurale, en Sierra Léone, Libéria et Côte d'Ivoire. Du fait des plus faibles prévalence et transmissibilité du VIH-2 et de la distance génétique élevée entre ses différents groupes, seulement deux recombinants du VIH-2 ont été décrits à ce jour : le CRF01_AB et un URF (Ibe et al., 2010; Visseaux et al., 2016b).

Alors qu'il n'existe actuellement pas de sous-types pour le VIH-2, une étude menée sur une cohorte française de patients VIH-2 vient de montrer que le groupe A pourrait présenter deux génotypes distincts, associés à des distributions géographiques différentes : A1 (Guinée-Bissau et Sénégal) et A2 (Côte d'Ivoire et Mali) (Visseaux et al., 2016a).

1.3.4 Epidémiologie moléculaire du VIH-1

La répartition des différents types, groupes, sous-types et recombinants du VIH est très hétérogène à travers le monde, tant au niveau de la distribution géographique, que du nombre de personnes infectées. Le VIH-1 M, responsable de l'épidémie mondiale, est représenté par les sous-types et CRFs suivants : C (48%), A (12%), B (11%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (5%), G (5%) et D (2%) (**Figure 10**) (Hemelaar et al., 2011). Les sous-types F, H, J et K représentent <1% des infections à VIH-1 dans le monde, et les autres CRFs et URFs en représentent 4%. Au final, environ 20% des infections mondiales sont dues à des formes recombinantes circulantes et uniques (CRFs/URFs).

1.3.4.1 Diversité génétique des VIH-1 circulant en Afrique sub-saharienne

L'Afrique de l'Ouest et Centrale est caractérisée par une grande diversité génétique de VIH circulants. Elle est la plus élevée dans les pays du bassin du Congo où se situe l'origine des différents groupes du VIH-1 et l'émergence de l'épidémie du VIH-1 M : soit Cameroun et RDC mais aussi Angola, Gabon, Guinée Equatoriale, République du Congo (RC) et République Centrafricaine (RCA) (Niama et al., 2006; Peeters et al., 2014). Actuellement, les groupes divergents O, N et P du VIH-1 restent principalement restreints à leur pays d'origine, le Cameroun, où la prévalence est estimée à moins de 1% pour le VIH-1 O (Villabona-Arenas et al., 2015). Seulement une vingtaine de cas ont été décrits à ce jour pour le VIH-1 N et deux cas pour le VIH-1 P (Delaugerre et al., 2011; Plantier et al., 2009).

En Afrique de l'Ouest, CRF02_AG est majoritaire (50-80%) et CRF06_cpx circule aussi dans des proportions importantes (20-50%) dans certains pays (Burkina Faso, Niger, Nigeria et Togo) (Peeters et al., 2013). Au Sud de l'Afrique, l'épidémie est presque exclusivement liée au sous-type C, représentant quasiment 100% des infections en Afrique du Sud, Botswana, Malawi, Mozambique, Swaziland et Zimbabwe. En Afrique de l'Est, VIH-1 C prédomine aussi au Burundi et en Ethiopie. Dans d'autres pays comme le Kenya, le Rwanda et la Tanzanie, il co-circule avec VIH-1 A et D ainsi que de nombreux URFs.

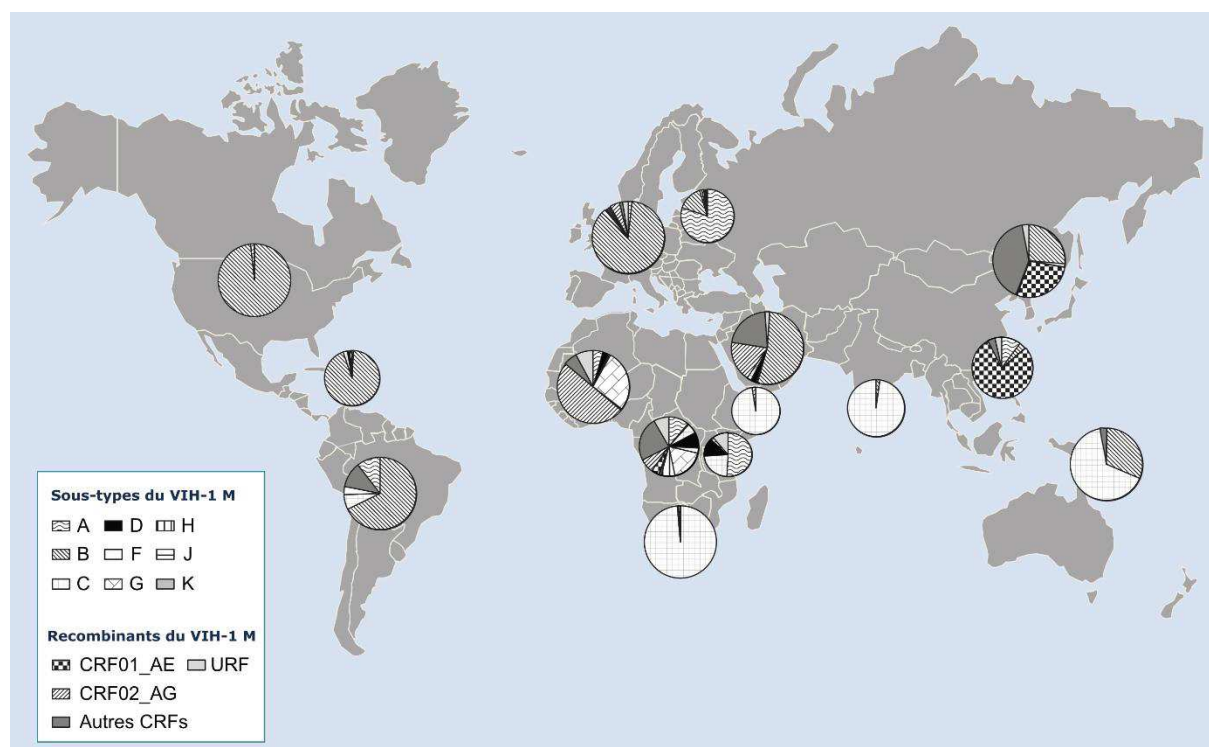


Figure 10. Distribution des sous-types et des formes recombinantes circulantes (CRFs) du VIH-1 M dans le monde, en 2007 (modifié d'après Peeters et al., 2013).

1.3.4.2 Variants du VIH-1 circulant dans les autres régions du monde

En Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest, le sous-type B est largement prédominant. Toutefois, la proportion des autres variants du VIH-1 M, importés par les populations migrantes, tend à augmenter en Europe de l'Ouest (Chaix et al., 2013; Hernando et al., 2015). En Europe de l'Est et surtout en Russie, les sous-types A et B dominent ainsi que CRF03_AB chez les usagers de drogues injectables (UDIs) (Bobkov et al., 2004). En Amérique du Sud, en plus des sous-types B et F, il y a une proportion importante de recombinaisons BF représentés par presque 15 CRFs et de nombreux URFs². Au Brésil, le sous-type C est présent dans le sud du pays et plusieurs recombinaisons BC y circulent. En Asie, VIH-1 C circule surtout

en Inde. CRF01_AE est fréquemment observé chez les hétérosexuels en Chine, ainsi que les recombinaisons BC chez les UDIs. Enfin, en Asie du Sud-Est, CRF01_AE (majoritaire), VIH-1 B et plusieurs de leurs recombinaisons co-circulent.

1.4 Épidémiologie mondiale du VIH

Depuis le début de l'épidémie, 78,0 millions (69,5-87,5 millions) de personnes ont été infectées par le VIH et un peu moins de la moitié (35 millions environ) sont décédées de maladies liées au SIDA (UNAIDS, 2016a). Ainsi, on estime que 36,7 millions (34,0-39,8) de personnes dans le monde vivaient avec le VIH en 2015, d'après le dernier rapport de l'ONUSIDA : Organisation Nations Unies sur le VIH/SIDA (UNAIDS, 2016a, 2016b). En réalité, il est possible que ce chiffre soit plus proche de 38,8 millions (37,6-42,4) (GBD 2015 HIV, 2016). Quoiqu'il en soit, presque 95% des adultes et des enfants infectés par le VIH vivent dans des pays à bas et moyens revenus (simplifiés par Pays du Sud), la population restante étant dans les pays à hauts revenus (simplifiés par Pays du Nord) (**Figure 11**).

Avec plus de 25 millions de cas, l'Afrique sub-saharienne est la région la plus touchée par l'épidémie de VIH/SIDA : 19,0 millions (17,7-20,5) vivent en Afrique de l'Est et du Sud (soit 50% environ de la population mondiale infectée) ; et 6,5 millions (5,3-7,8) vivent en Afrique de l'Ouest et Centrale (soit presque 20% de la population mondiale infectée). Au sein de cette épidémie mondiale généralisée, il existe des sous-épidémies concentrées au sein de différents groupes de populations à risques, où l'incidence et la prévalence de l'infection sont plus élevées que dans la population générale (**Figure 11**) (Piot et al., 2015; Tanser et al., 2014).

L'accès au TAR dans les pays du Sud a permis de réduire l'incidence mondiale de l'infection à VIH d'environ 35% en 15 ans, avec : 3,1 millions (3,0-3,3) de nouveaux cas en 2000 *versus* 2,1 millions (1,8-2,4) en 2015, dont 150 000 (110 000-190 000) nouveau-nés (UNAIDS, 2016a) (**Figure 12**). En Afrique sub-saharienne, la contamination est principalement hétérosexuelle : plus de la moitié des nouvelles infections chez les adultes et les adolescents surviennent chez des femmes, dont la moitié environ est âgée de 15 à 24 ans (**Figure 11**) (Piot et al., 2015; UNAIDS, 2016a). Le TAR a aussi fait diminuer la mortalité mondiale de plus de 40% depuis le pic de décès de 2005 [2,0 millions (1,7-2,7)] (**Figure 12**).

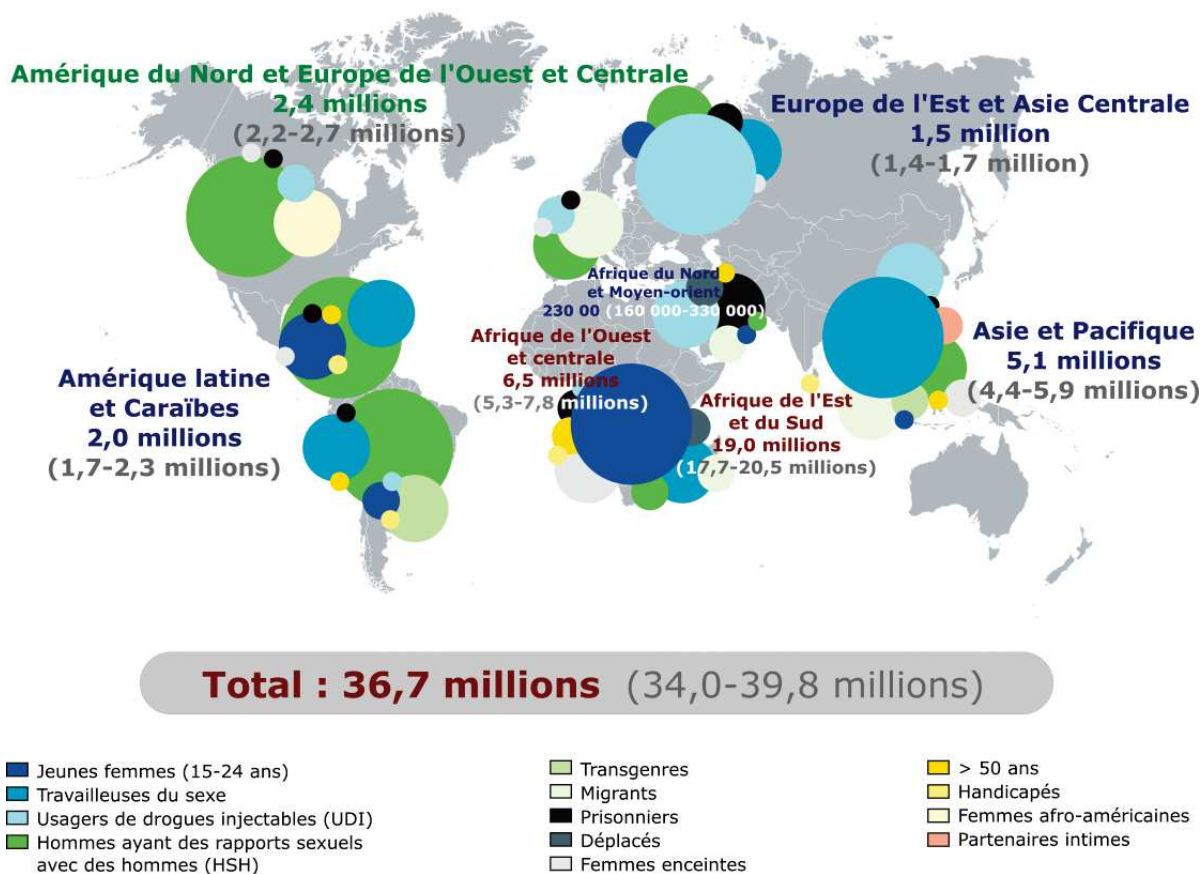


Figure 11. Carte indiquant la distribution géographique des adultes et des enfants vivant avec le VIH dans le monde en 2015, ainsi que les populations à risques.

Les pays du Nord sont indiqués en vert. Les pays du Sud sont indiqués en bleu ; parmi-eux, l'Afrique subsaharienne qui est la plus touchée par l'épidémie de VIH/SIDA est indiquée en rouge (modifié et adapté d'après Piot et al., 2015; UNAIDS, 2016b).

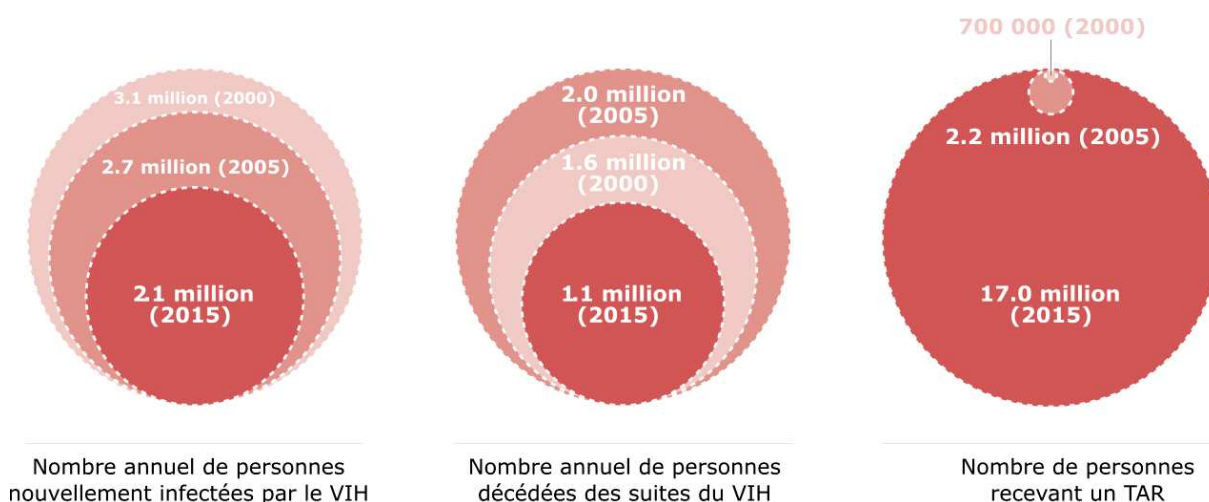


Figure 12. Progrès dans la réponse à l'épidémie de VIH/SIDA à travers le monde, entre 2000 et 2015 (modifié et mis à jour d'après WHO, 2015a).

Cependant, avec 1,1 millions (1,7-2,7) de décès en 2015, le VIH/SIDA reste une condamnation à mort pour de nombreux patients vivant dans les pays du Sud. D'après Médecins sans Frontières (MSF), la situation est particulièrement préoccupante en Afrique de l'Ouest et Centrale où surviennent 30% de ces décès, alors que cette région représente environ 20% de la population mondiale infectée (MSF, 2016). La prise en charge des patients infectés par le VIH est comparable à une course barrée d'obstacles (ex. volonté politique limitée, systèmes de santé faibles) qui empêchent d'améliorer l'accès au TAR et au suivi virologique, contrairement aux pays d'Afrique de l'Est et du Sud pourtant plus affectés. Globalement, malgré les incroyables progrès réalisés concernant l'accès au TAR (**partie 4.1**), 54% (50-57) des patients vivant actuellement avec le VIH dans le monde n'y ont pas accès, et beaucoup d'entre eux ne sont pas au courant de leur séropositivité (UNAIDS, 2016b).

Chapitre 2. Antirétroviraux

2.1 Principales molécules

De 1987 à nos jours, 28 molécules antirétrovirales et un inhibiteur d'isoenzyme CYP3A4 (Cobicistat) ont été approuvés par la FDA (**Figure 13**). Elles sont divisées en différentes classes thérapeutiques, définies par leur mécanisme d'action inhibitrice au niveau d'une étape du cycle de réplication du VIH (**partie 1.2.3**) : **(1) Inhibiteurs d'entrée**, comprenant deux classes, avec les **antagonistes du co-récepteur CCR5** (Maraviroc) et les **inhibiteurs de fusion** (Enfuvirtide) ; **(2) Inhibiteurs de la transcriptase inverse**, comprenant deux classes, avec les **analogues nucléos(t)idiques (INTI)**, ainsi que les **analogues non nucléosidiques (INNTI)** ; **(3) Inhibiteurs de l'intégrase (II)** ; **(4) Inhibiteurs de la protéase (IP)**.

Les antirétroviraux (ARVs) ne sont donc pas des molécules virucides : ils agissent sur le virus qui se réplique, et non sur le provirus des cellules en latence (CD4 mémoires) qui représentent les réservoirs de l'infection. En fonction des molécules, ils ont aussi une diffusion plus ou moins limitée pour atteindre certains sites « sanctuaires » de l'organisme (cerveau, ganglions, tube digestif, compartiment génital), où l'on peut observer une réplication résiduelle. Ainsi, toute interruption de TAR entraîne une reprise de la réplication du VIH.

Dans cette partie, les ARVs généralement utilisés seront brièvement décrits, surtout ceux anciennement et nouvellement recommandés dans les pays du Sud par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**partie 4.2.2**). Nous ne traiterons donc pas des inhibiteurs d'entrée qui sont indisponibles dans les pays du Sud et qui, dans les pays du Nord sont le plus souvent utilisés en cas d'échec virologique avec des multirésistances, notamment du fait de : la spécificité du Maraviroc pour les virus à tropisme CCR5 ; ainsi que la forme d'administration injectable sous-cutanée de l'Enfuvirtide, qui est plus ou moins bien tolérée et acceptée.

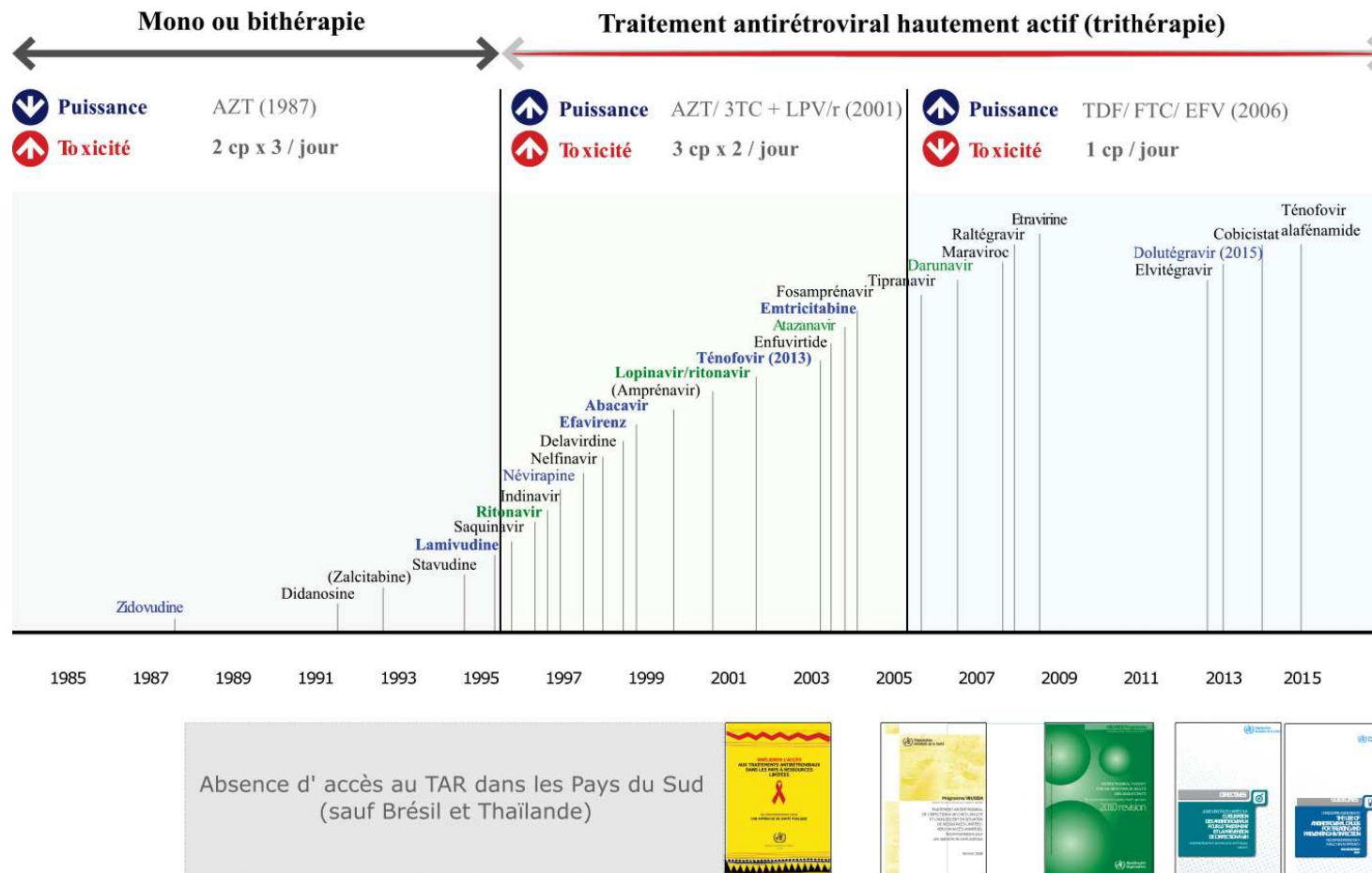


Figure 13. Evolutions chronologiques des molécules antirétrovirales approuvées par la FDA, et des différentes recommandations de l’OMS concernant le TAR dans les Pays du Sud.

Les antirétroviraux (ARVs) qui sont actuellement disponibles dans les pays du Sud et qui sont recommandés pour le TAR de 1^{ère} ligne sont colorés en **bleu**, et ceux pour le TAR de 2^{ème} ligne sont colorés en **vert**. Les molécules à privilégier actuellement, d’après les recommandations 2016 de l’OMS, sont colorées en **gras**, ce qui correspond à TDF+XTC+NPV (1^{ère} ligne) et à l’introduction des IPs (LPV/r ou ATV/r) en 2^{ème} ligne chez les adultes et les adolescents. L’abacavir est recommandé chez les enfants de 3 à 10 ans (modifié d’après UNAIDS, 2015).

2.1.1 Inhibiteurs de la transcriptase inverse

2.1.1.1 Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse

Les Inhibiteurs Nucléos(t)idiques de la Transcriptase Inverse (INTIs) sont : Abacavir (ABC), Didanosine (ddI), Emtricitabine (FTC), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et Ténofovir alafénamide fumarate (TAF), ainsi que Zidovudine (AZT). Leur structure chimique représente des 2', 3'-didéoxynucléotides (ddN) : c'est-à-dire des analogues des bases pyrimidiques (cytosine et thymine) et puriques (adénine et guanine) constitutives des acides nucléiques, qui sont liés à un résidu osidique dépourvu de groupement hydroxy (OH) en 2' et 3' (**Figure 14**) (Menéndez-Arias, 2013). Ce sont tous des pro-drogues : elles doivent être nécessairement bi-phosphorylées (pour les analogues nucléotidiques, TDF et TAF) ou tri-phosphorylées (pour les autres analogues nucléosidiques) par les kinases cellulaires, afin d'être pharmacologiquement actives.

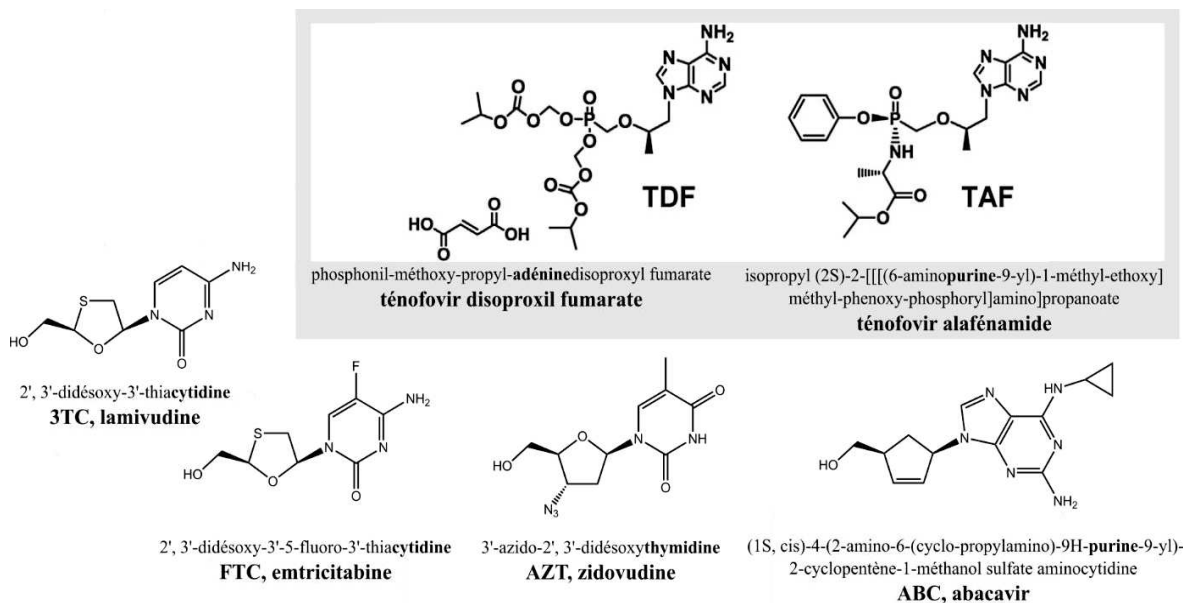


Figure 14. Structures chimiques des principaux INTIs, analogues des dNTPs naturels.

Le TDF, encadré en **gris**, est recommandé dans le TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud depuis 2013. Le TAF est une autre pro-drogue du ténofovir (TFV) qui a été récemment approuvée. Ce sont des analogues nucléotidiques (avec un groupement phosphate) de l'adénosine. De plus, 3TC et FTC (gauche) sont des analogues nucléosidiques de la cytidine. AZT (centre) est un analogue de la thymidine, comme le d4T qui n'est plus recommandé. Enfin, l'ABC (droite) est un analogue nucléosidique de la Guanosine (modifié et mis à jour d'après Menéndez-Arias, 2013).

Au cours de la transcription inverse de l'ARN viral, ces inhibiteurs compétitifs des déoxynucléosides triphosphates (dNTPs) naturels vont être ajoutés au brin d'ADN par la RT. L'absence de groupement OH en 3' empêche l'ajout du dNTP suivant, bloquant alors prématurément l'élongation de l'ADN viral. La RT ne peut corriger cette incorporation défective, en l'absence d'activité exonucléasique 3'-5', et ainsi, les INTIs sont parfois appelés « *terminateurs de chaîne* ».

Avec les INTIs, les interactions médicamenteuses sont rares. Cependant, ils exercent aussi une action inhibitrice sur l'ADN polymérase γ mitochondriale, capable d'induire, à des degrés divers, une toxicité sur plusieurs organes (myopathies, lipoatrophies, neuropathies périphériques, pancréatites...). Du fait de cette toxicité, les INTIs de «1^{ère} génération» (AZT, d4T et ddI) ne sont plus recommandés dans les pays du Nord. Par contre, l'AZT reste utilisée dans les pays du Sud, où elle est recommandée dans les TAR de 1^{ère} ligne (en remplacement du TDF) et de 2^{ème} ligne (en première intention, en cas d'échec sous TDF).

Le TAF vient d'être mis sur le marché en formulations combinées avec soit Emtricitabine (FTC) (Descovy®), soit Elvitégravir/c/FTC (Genvoya®). Comme le TDF, c'est une pro-drogue du Ténofovir dont l'avantage réside en de meilleures propriétés pharmacologiques avec des concentrations intracellulaires plus élevées et des concentrations plasmatiques plus faibles (10 ou 25 mg de TAF vs 200 ou 300 mg de TDF) (Ray et al., 2016). Il en résulte une moindre toxicité rénale et osseuse, ainsi qu'une barrière génétique qui pourrait être plus élevée (Gallant et al., 2016; Margot et al., 2016; Sax et al., 2015). La barrière génétique d'une molécule ARV correspond à sa capacité à ne pas sélectionner des souches résistantes lorsqu'une faible virémie persiste (**paragraphe 2.2.1.2**).

2.1.1.2 Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse

Les principaux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs) sont : Efavirenz (EFV) et Névirapine (NVP) comme molécules de 1^{ère} génération; Etravirine (ETR) et Rilpivirine (RPV) comme molécules de 2^{ème} génération. Ils sont structurellement et fonctionnellement différents des INTIs (**Figure 15**).

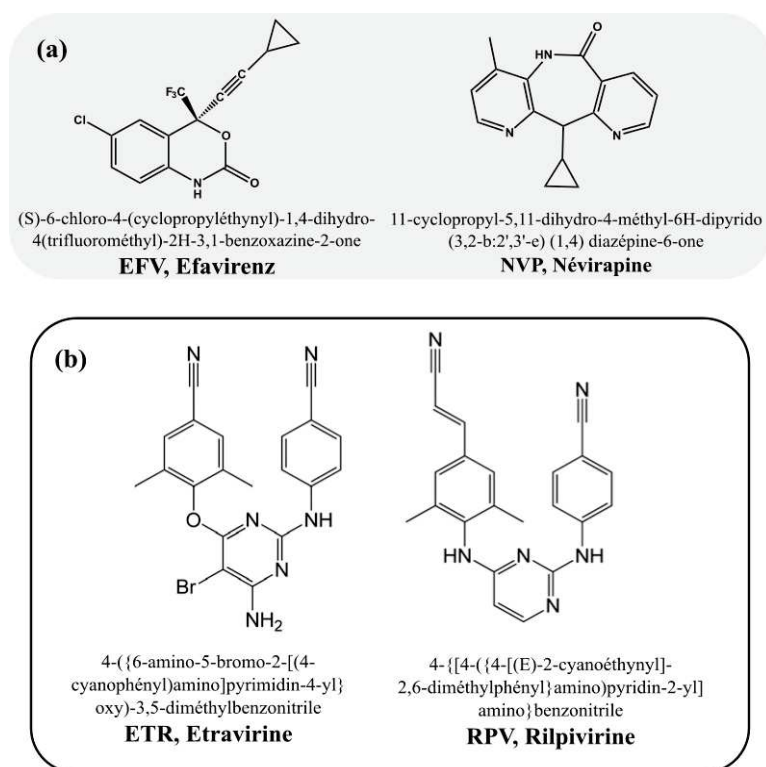


Figure 15. Structures chimiques des principaux INNTIs, analogues non-nucléosidiques des dNTPs naturels. (a) molécules de 1^{ère} génération, généralement recommandées dans le TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud (gris), (b) molécules de 2^{ème} génération : diarylpyrimidine (DAPY) (modifié d'après Menéndez-Arias, 2013).

La transcriptase inverse (RT) est un hétérodimère formé par la sous-unité p51 (stabilisatrice) et p66 (active). La structure cristallographique de cette dernière s'illustre par une « main droite ouverte », constituée des cinq domaines suivants : doigts, paume, pouce, région de connexion et RNase H (**figure 16**) (Das and Arnold, 2013; Menéndez-Arias, 2013). Le site actif de polymérisation de l'ADN proviral, formé d'un motif des quatre acides aminés « YMDD » (Tyrosine, Méthionine, Acide aspartique, Acide aspartique), est situé dans l'espace situé entre la « paume », le « pouce » et les autres « doigts ». Les INNTIs agissent de façon non-compétitive, en créant une liaison forte et spécifique avec un site allostérique situé à proximité (~ 10 Å) de ce site catalytique, au sein d'une poche hydrophobe. Il en résulte une perte de la flexibilité de la RT du VIH-1 qui altère sa capacité de synthèse de l'ADN viral. Les VIH-2 ainsi que plus de 60% des VIH-1 groupe O sont naturellement résistants aux INNTIs (Ren et al., 2002; Tebit et al., 2016).

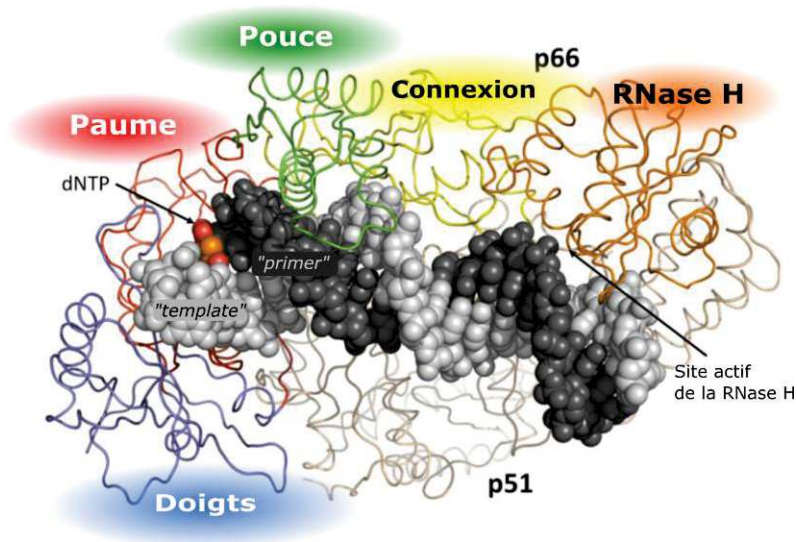


Figure 16. Structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1 (modifié d'après Das et Arnold, 2013).

Du fait de leur métabolisation hépatique, les interactions médicamenteuses sont nombreuses avec les INNTIs, avec des effets inducteurs ou inhibiteurs sur le système du cytochrome P450 (CYP). En début de TAR, les INNTIs de 1^{ère} génération induisent souvent des effets secondaires tels que des troubles neuropsychiatriques (avec EFV) ou une hypersensibilité à l'origine d'exanthèmes et d'hépatites aiguës exceptionnellement fulminantes (avec NVP). Pour cette raison, la NVP n'est plus prescrite dans les pays du Nord, alors qu'elle reste recommandée en TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud (en alternative à l'EFV qui semble mieux toléré) (Ford et al., 2015a; Shubber et al., 2013). La diminution du dosage de l'EFV de 600 à 400 mg a montré une non-infériorité de l'efficacité et un risque plus faible d'effets indésirables après 96 semaines de TAR (ENCORE1 Study Group et al., 2015). Faisant partie des nouvelles stratégies alternatives de TAR proposées par l'OMS, elle est actuellement testée dans les pays du Sud (ex. projet NAMSAL/ANRS 12313, au Cameroun) (WHO, 2016a).

Une meilleure tolérance est également observée avec les molécules de 2^{ème} génération (ETR et RPV), non recommandées par l'OMS dans les pays du Sud (Nelson et al., 2013). Concernant RPV, une nanoformulation injectable à durée longue d'action est en cours de développement clinique : en association avec un nouvel inhibiteur d'intégrase (Cabotégravir, GSK1265744) en TAR de 1^{ère} ligne, mais aussi seule (TMC278LA) en PReP (prophylaxie pré-exposition) (Margolis et al., 2015; Penrose et al., 2016). Dans cette dernière indication, l'émergence d'une souche résistante (K101EK) vient d'être décrite, avec la séroconversion d'un virus sauvage «sensible» 40 jour après l'administration par voie intra-musculaire de la plus faible dose testée (300 mg) (Penrose et al., 2016).

2.1.2 Inhibiteurs de la protéase

A partir de 1996, les inhibiteurs de protéase (IPs) de 1^{ère} génération, comprenant Amprénavir (APV), Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), puis Lopinavir (LPV) ont révolutionné le pronostic de la maladie VIH/SIDA. Mis à part LPV, ils ne sont plus couramment utilisés (**Figure 17**). Les IPs de 2^{ème} génération ont ensuite été développés afin d'améliorer la tolérance et diminuer la sélection de résistance : Fosamprénavir (FPV), Tipranavir (TPV), ainsi que Atazanavir (ATV) et Darunavir (DRV) qui représentent désormais les molécules les plus utilisées (Iyidogan et Anderson, 2014). Le VIH-2 possède une sensibilité réduite aux IPs, excepté au DRV, LPV et SQV (Raugi et al., 2016).

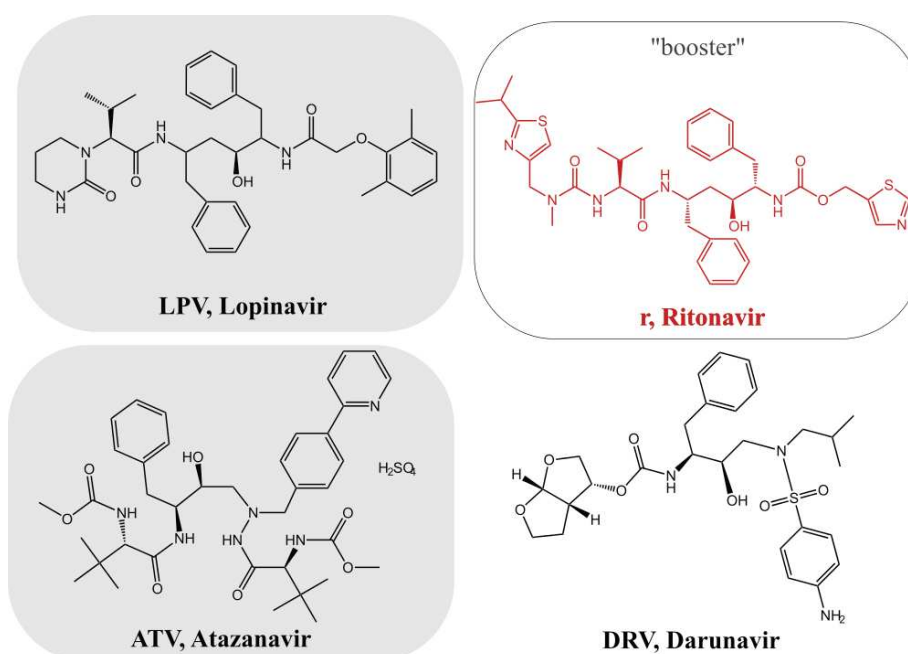


Figure 17. Structures chimiques des principaux IPs.

Les IPs principalement recommandés par l'OMS en TAR de 2^{ème} ligne dans les pays du Sud sont encadrés en gris. Ils sont systématiquement associés à un « booster », comme RTV (r, rose) (modifié d'après Menéndez-Arias, 2013).

Les IP interviennent dans la phase tardive du cycle, en inhibant le site actif de la protéase, qui est l'enzyme virale intervenant dans l'étape de maturation, indispensable pour produire des virus infectieux (**partie 1.2.3**) (Freed, 2015). A l'exception du TPV, ce sont des peptidomimétiques dans lesquels la liaison scissible par la protéase est remplacée par un groupe non clivable. Les IPs couramment utilisés possèdent une très forte barrière génétique, ce qui

signifie qu'en cas d'inhibition incomplète de la réplication, la sélection de mutations est progressive avant l'obtention d'une résistance phénotypiquement significative.

Etant métabolisés par les enzymes hépatiques du CYP3A4, les IPs provoquent des interactions médicamenteuses fréquentes, à la fois liées à des effets inducteurs et inhibiteurs. L'effet inhibiteur puissant du RTV sur le CYP3A4 a été mis à profit pour inhiber le métabolisme de l'IP qui lui est associé, afin d'améliorer la biodisponibilité de ce dernier (Hsu et al., 1998). Ainsi, les IPs sont systématiquement renforcés pharmacologiquement par une molécule à faible dose appelée « booster », comme RTV à 100 mg (r). Pour la même indication, une nouvelle molécule n'ayant pas d'activité antirétrovirale et inhibant plus sélectivement le CYP3A4 que RTV a été développée et testée : le Cobicistat à 150 mg (c) (Gallant et al., 2013, 2015). Elle vient d'être approuvée, en association avec ATV (Evotaz®) ou DRV (Rezolsta®) dans les pays du Nord, ainsi que sous forme générique associée avec ATV dans les pays du Sud (Vitoria et al., 2016). Les effets indésirables observés avec les IPs sont des troubles digestifs (ex. diarrhées) et métaboliques, des lipohypertrophies, ainsi qu'une augmentation du risque cardiovasculaire.

2.1.3 Inhibiteurs d'intégrase et l'arrivée du Dolutégravir au Sud

Les inhibiteurs d'intégrase (INIs) sont les ARVs les plus récemment commercialisés, avec : Elvitégravir (EVG) en 2007, puis Raltégravir (RAL) (1^{ère} génération), ainsi que Dolutégravir (DTG) (2^{ème} génération) en 2013 (**Figure 18**). Ils constituent une classe majeure dans l'arsenal thérapeutique car ce sont des molécules puissantes avec un bon profil de tolérance (aucune toxicité métabolique et osseuse).

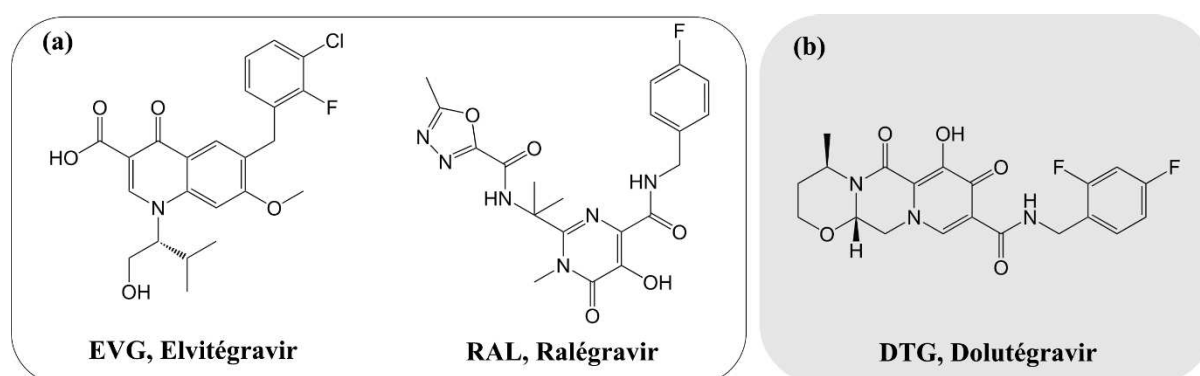


Figure 18. Structures chimiques des principaux INIs :

(a) molécules de 1^{ère} génération, (b) Dolutégravir (DTG), molécule de 2^{ème} génération nouvellement recommandée par l'OMS dans le TAR de 1^{ère} ligne (en deuxième intention) dans les pays du Sud (gris) (modifié d'après Menéndez-Arias, 2013).

Les INIs agissent au niveau de la phase précoce du cycle de réplication du VIH, en inhibant l'intégration de l'ADN virale dans le chromosome de la cellule hôte. Cette intégration comprend deux étapes importantes : **(1) « 3' processing »**, qui permet de cliver un dinucléotide au niveau des extrémités 3'-LTRs de l'ADN virale afin de générer l'extrémité réactive terminale CpA 3'-OH ; **(2) « transfert de brin »**, qui permet le transfert de l'ADN viral par liaison du groupement terminal 3'-OH de l'ADN viral au groupement phosphate en 5' du chromosome de la cellule hôte (Craigie, 2012). Les INIs inhibent cette seconde étape, en se liant au niveau du site actif de l'intégrase (acides aminés 50-212). Ce site contient notamment le « motif DDE » formé des résidus Asp⁶⁴, Asp¹¹⁶ et Glu¹⁵² qui coordonnent les cations divalents (Mg²⁺ ou Mn²⁺) nécessaires pour le transfert de brin (Goldgur et al., 1998).

Parmi les trois molécules de la classe, RAL possède le moins d'interactions médicamenteuses car il n'est pas métabolisé par le CYP450. Son inconvénient principal réside dans sa posologie en deux prises quotidiennes. La combinaison RAL + LPV/r est une nouvelle stratégie alternative proposée par l'OMS dans les pays du Sud (WHO, 2016a). Quant à EVG, il requiert d'être renforcé pharmacologiquement par un « booster » (Ritonavir ou Cobicistat). Dans les pays du Nord, EVG/c est commercialisé en un seul comprimé unique quotidien, en association avec TDF/FTC (Stribild®) et récemment TAF/FTC (Genvoya®). Le profil de résistance de EVG est similaire au RAL et ces molécules de 1^{ère} génération ont une faible barrière génétique (Fourati et al., 2015).

DTG (2^{ème} génération) possède une barrière génétique plus élevée que les molécules de 1^{ère} génération et d'une plus grande puissance, permettant une administration unique quotidienne (50 mg) (QD, *once daily* en anglais). La puissance d'une molécule ARV est déterminée par sa capacité à réduire la charge virale plasmatique. Récemment testé dans 3 essais cliniques chez des patients naïfs de TAR, en combinaison avec ABC/3TC ou TDF/FTC, DTG a montré une non-infériorité d'efficacité à RAL et une supériorité d'efficacité à EFV et DRV/r. (Molina et al., 2015; Raffi et al., 2013; Walmsley et al., 2015, 2013). Il a aussi montré son efficacité chez des patients en échec de TAR dans les pays du Nord, dont ceux qui avaient des résistances aux INIs de 1^{ère} génération (avec une administration en deux doses de 50 mg/jour : BID, *twice daily* en anglais) (Cahn et al., 2013; Castagna et al., 2014).

L'OMS vient de recommander DTG en stratégie alternative dans le TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud où il est actuellement testé (avec par exemple le projet NAMSAL/ANRS 12313, au Cameroun) (WHO, 2016a). Dans les pays du Nord, il est évalué en monothérapie dans le cadre de stratégies allègement thérapeutique chez des patients en succès virologique

(Katlama et al., 2016; Rokx et al., 2016). Enfin, une nanoformulation injectable à longue durée d'action composée par un analogue du DTG (Cabotegravir, GSK1265744) combiné à RPV est en cours de développement clinique (Margolis et al., 2015). L'objectif est de proposer une seule administration intramusculaire toutes les quatre semaines afin de faciliter l'observance de certains patients et d'élargir les options de TAR ou PrEP.

2.2 Résistance du VIH aux molécules antirétrovirales

2.2.1 Origine et sélection de la résistance

2.2.1.1 Principes

La résistance du VIH peut être définie comme la capacité du virus à se répliquer en présence d'une ou plusieurs molécules ARVs à des concentrations inhibant la réplication d'un virus sauvage sensible. Elle provient de la variabilité génétique intra-individuelle du VIH-1 s'expliquant à la fois par : le taux élevé de réplication du VIH-1 (jusqu'à 10^{10} virus par jour, chez un patient non traité), son taux élevé de mutations (~ 1 mutation nucléotidique par cycle viral) ; ainsi que par des recombinaisons fréquentes (**paragraphe 1.2.3.3**) (Geretti, 2006; Hemelaar, 2012; Ho et al., 1995; Meyer et al., 1999). Les mutations sont générées par la RT qui est dépourvue d'activité correctrice exonucléasique 3'-5' (Roberts et al., 1988).

Les mutations surviennent donc de façon aléatoire et la plupart du temps, elles sont délétères pour le virus. Toutefois, certaines d'entre elles sont viables et vont générer des variants minoritaires, appelés aussi « quasi-espèces » (~ 10% de la population virale totale). Parmi ces variants, peuvent se trouver des souches résistantes aux ARVs, qui possèdent une ou plusieurs mutations au niveau du gène *pol*, codant généralement pour les cibles thérapeutiques principales de la protéase (PR), la région polymérase de la transcriptase inverse (RT), et de l'intégrase (II). Il existe aussi des mutations dans les domaines C-terminaux de la RT (domaine de connexion et RNase H) qui augmenteraient la résistance des souches ayant déjà des mutations aux INTIs (TAMs et M184V) et à certains INNTIs. Toutefois, elles ne sont pas analysées en routine car leur interprétation clinique est encore mal connue (Delviks-Frankenberry et al., 2013; Maiga et al., 2012; Muniz et al., 2014; von Wyl et al., 2010).

La résistance du VIH aux ARVs est donc un mécanisme d'évolution naturelle, qui permet au VIH d'échapper à la fois au système immunitaire mais aussi à la pression antirétrovirale (Tang et Shafer, 2012). En l'absence de TAR, la souche sauvage qui est généralement bien adaptée à l'environnement naturel de son hôte va se répliquer davantage, comparé aux variants minoritaires ayant une capacité répliquative (*fitness* en anglais) moindre. C'est donc la souche sauvage qui prédomine largement chez un patient non traité. En présence d'un TAR, les mutations associées à la résistance aux ARVs (mutations de résistance, pour simplifier) apportent un avantage répliquatif plus ou moins important aux variants minoritaires correspondants. Ces derniers étant moins inhibés par le TAR, ils vont pouvoir se répliquer et émerger jusqu'à devenir à leur tour majoritaires, surtout dans les cas les plus courants où la souche sauvage est sensible. Comme le TAR associée au VIH/SIDA est à vie, l'émergence d'un certain degré de résistance aux ARVs est attendue chez les patients traités (même en cas de schéma thérapeutique approprié et de niveau d'observance optimal).

En pratique, on distingue plusieurs catégories de résistances. La **résistance acquise** (ADR, *acquired drug resistance* en anglais) survient lorsque la pression de sélection exercée par le TAR entraîne l'émergence de résistance chez un patient recevant un TAR. La **résistance transmise** (TDR, *transmitted drug resistance*, en anglais) survient quant à elle chez les patients ayant été directement infectés par une souche résistante. La **résistance pré-thérapeutique** (PDR, *pre-treatment drug resistance*, en anglais) concerne les patients initiant un TAR et qui peuvent avoir des résistances soit transmises, soit acquises au cours d'une exposition préalable aux ARVs (prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant (PTME), prophylaxie post- ou pré-exposition [PrEP], ou TAR antérieur). Plus rarement, on observe une **résistance naturelle** qui survient chez des virus n'ayant jamais subi de pression du TAR, comme avec les INNTIs et pour le VIH-2 et plus de 60% des VIH-1 O (Poveda et al., 2005; Ren et al., 2002; Tebit et al., 2016). Le VIH-2 est aussi naturellement résistant à l'Enfuvirtide (inhibiteur de fusion) et possède une sensibilité réduite à plusieurs IPs (Poveda et al., 2005; Raugi et al., 2016). Avec ces deux virus, un TAR de 1^{ère} ligne à base d'IP (LPV/r) doit être utilisé à la place des INNTIs généralement recommandés dans les pays du Sud (**partie 4.2**).

2.2.1.2. Déterminants de la résistance du VIH-1 aux ARVs

Les facteurs contribuant à la sélection de mutations associées à la résistance du VIH-1 aux ARVs (mutations de résistance, pour simplifier) peuvent être regroupés dans les 4 catégories suivantes : **(1) TAR, (2) virus, (3) patient (hôte), et (4) environnement.**

Même si un seul facteur suffit parfois (ex. inobservance du TAR), la sélection des mutations de résistance peut-être aussi multi-factorielle.

(1) Facteurs liés au TAR : la notion barrière génétique s'applique aux molécules du TAR. Elle correspond à leur capacité à ne pas sélectionner des souches résistantes lorsqu'une faible virémie persiste. En pratique, elle dépend de plusieurs conditions : (1) nombre et type (transition < transversion) de changements nucléotidiques nécessaires pour obtenir une mutation de résistance, (2) impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'ARV, (3) impact de cette mutation sur la capacité de réplication virale. Comme nous l'avons vu précédemment (**partie 2.1**), les TAR à base d'INNTIs ont une barrière génétique plus faible que ceux à base d'IPs/r, sélectionnant ainsi plus rapidement des mutations associées à la résistance (**Figure 19**).

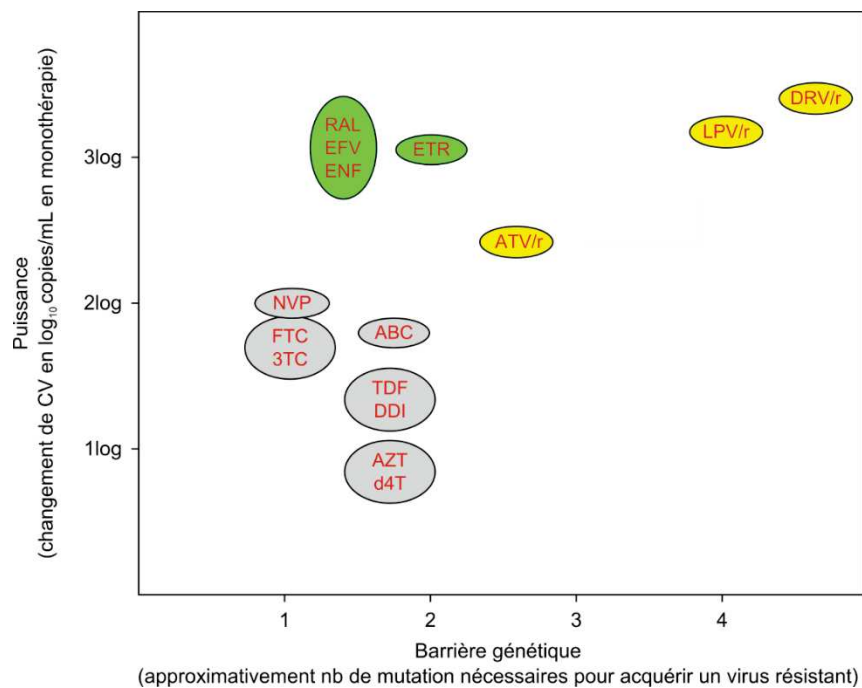


Figure 19. Schéma de la barrière génétique et de la puissance des principaux ARVs couramment utilisés.

Les INNTIs et INTIs généralement utilisés en TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud sont colorés en **gris**. Les IPs indiqués en TAR de 2^{ème} ligne sont colorés en **jaune** et les INIs en **vert** (modifié d'après Tang et Shafer, 2012).

De plus, le risque d'émergence de la résistance est plus élevé en cas d'administration de schémas thérapeutiques sous-optimaux, qui par exemple ne comprennent qu'un ou deux ARVs suite à de mauvaises pratiques de prescription ou à des ruptures de stock fréquentes dans certains pays du Sud. A l'inverse, l'utilisation de schémas complexes avec un nombre élevé de

comprimés est associée à une diminution de l'observance, favorisant aussi l'émergence de la résistance. L'utilisation de formulations combinées à dose fixe avec un seul comprimé par jour favorise l'observance et diminue le risque de sélection de mutation de résistance. L'utilisation de molécules puissantes limite aussi ce risque. Les interactions médicamenteuses peuvent aussi réduire les concentrations d'ARVs à des niveaux sous-optimaux. Enfin, l'exposition préalable aux ARVs, par exemple lors de l'emploi d'une dose unique de NVP pour la PTME, est susceptible d'entraîner une résistance pré-thérapeutique, pouvant conduire plus rapidement à des échecs virologiques et à l'accumulation de mutations de résistance. En cas de TAR, certains ARVs peuvent sélectionner des mutations qui provoquent aussi des résistances à des molécules auxquelles les patients n'ont pas encore été exposés, on parle alors de résistances croisées.

(2) **Facteurs liés au virus :** la fréquence et les caractéristiques des profils de mutations peuvent quelque fois varier en fonction des sous-types viraux. C'est le cas par exemple du VIH-1 C qui a une barrière génétique plus faible pour acquérir la V106M en présence d'INNTIs. En effet, le nombre de changements nucléotidiques nécessaire pour acquérir la V106M est égale à un pour le VIH-1 C (GTG → ATG), alors qu'il est de deux pour les VIH-1 B (GTA → ATG) (van de Vijver et al., 2006). De même, la mutation K65R émerge plus rapidement avec le VIH-1 C, en présence de d4T/TDF, du fait d'un polymorphisme unique autour de cette position qui est à l'origine d'un mécanisme de « pausing » au cours de la synthèse d'ADN (**Figure 20**) (Brenner et al., 2006; Coutsinos et al., 2009).

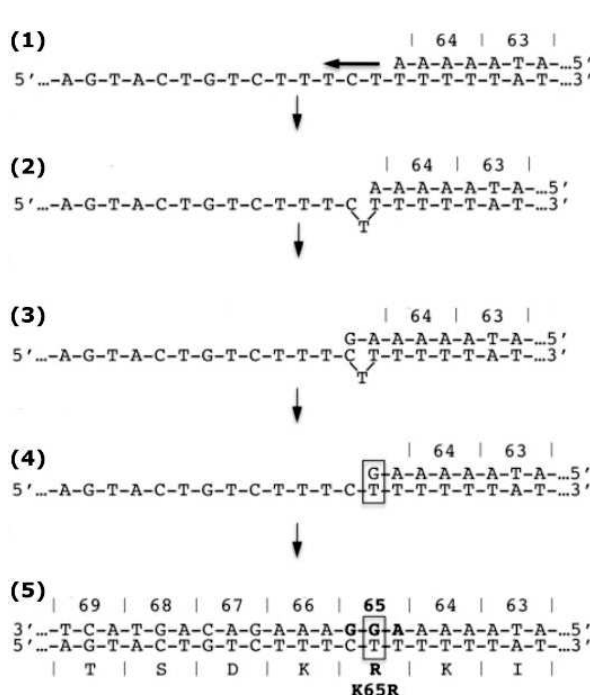


Figure 20. Description du mécanisme de « pausing » lié au polymorphisme unique du VIH-1 C à l'origine d'une émergence plus rapide de la mutation K65R en présence de TDF et d4T :

(1) Le VIH-1 C possède un polymorphisme unique (en positions 64, 65 et 66 de la RT) contenant un homopolymère constitué de nucléotides Adénine (A) se terminant en position 65, alors que chez les VIH non C cette série débute plutôt à cette position. (2) Au cours de la synthèse de l'ADN viral, l'ADN polymérase réalise un « pausing » à la fin de l'homopolymère, créant un repliement sur lui-même du brin d'ADN matrice à l'origine d'un mauvais alignement du nucléotide C ; (3) Un nucléotide G du brin d'ADN néosynthétisé se lie correctement au nucléotide C mal-aligné ; (4) Les deux brins d'ADN se ré-alignent correctement ; (5) Un deuxième nucléotide G est incorporé au nucléotide C ré-exposé pour la synthèse de l'ADN qui va pouvoir se poursuivre normalement (modifié d'après Garforth et al., 2014).

De plus, une étude menée sur environ 1 400 séquences de sous-types/CRFs différents (14% B, 49% C, 3% G ; 25% CRF01_AE, 4% CRF02_AG, 5% autres CRFs) a montré que la fréquence de certaines positions de mutations au niveau de la RT (41, 67, 70, 184, 215 et 219) était entre 9-20% plus élevée avec le VIH-1 C et CRF01_AE, comparé au VIH-1 B (Huang et al., 2016). De façon générale, ces variations ne permettent pas d'observer de différence significative d'efficacité des TAR entre les variants du VIH-1. Toutefois, elles justifient la nécessité d'un suivi virologique de routine adapté pour détecter précocement les échecs thérapeutiques dans les pays du Sud (Villabona-Arenas et al., 2016).

(3 & 4) Facteurs liés à l'hôte (patient) et à l'environnement : l'inobservance au TAR est un facteur majeur associé à la sélection de résistance puisqu'il engendre aussi une concentration sous-optimale d'ARVs. Dans les pays du Sud, ce phénomène est fortement **associé aux facteurs programmatiques (partie contexte 4.3.2)**. De plus, une mauvaise absorption du TAR et la variabilité inter-individuelle du métabolisme hépatique peuvent aussi être à l'origine de concentrations sous-optimales d'ARVs.

2.2.1.3 Fitness des souches résistantes et persistance des TDR

De façon générale, les mutations associées à une résistance dans RT et PR diminuent la capacité répliquative (*fitness* en anglais) du virus et par conséquent sa capacité de transmission sexuelle (Nijhuis et al., 2001; Wagner et al., 2012; Yang et al., 2015a). Pendant la transmission sexuelle du VIH, un seul variant génétique (*founder virus*, en anglais) est généralement transmis au receveur. Le phénomène de « goulot d'étranglement » (*bottleneck*, en anglais) permet effectivement de sélectionner celui qui possède le meilleur « *fitness* » parmi l'ensemble des « quasi-espèces » présentes chez le donneur (Carlson et al., 2014). Toutefois, ce biais de sélection n'empêche pas la transmission de souches résistantes, du moment que la charge virale est détectable et que ces souches deviennent prédominantes. S'il n'existe pas d'effet bénéfique de la mutation après la transmission chez le receveur, il est fréquent d'observer une réversion rapide de la souche résistante vers la souche sauvage. L'exemple le plus fréquent est celui de la M184V qui est associée à 3TC/FTC (**Figure 21**) (Jain et al., 2011; Pinggen et al., 2011). Chez certaines souches nécessitant plus d'une mutation pour revenir vers la souche sauvage, il est aussi possible d'observer des réversions incomplètes, qui peuvent persister en l'absence de pression du TAR (ex. formes revertantes de la T215YF).

Par contre, certaines mutations associées à la résistance réduisent de façon minime la capacité répliquative du VIH et peuvent persister longtemps en l'absence de pression du TAR. L'exemple le plus fréquent est celui de la K103N et plus généralement des mutations associées aux INNTIs. Certaines mutations TAMs associées aux INTIs sont également concernées. Enfin, l'accumulation de mutations compensatoires permet d'améliorer la capacité répliquative de certaines souches ayant acquis des mutations de résistance (Pingen et al., 2014a; Yang et al., 2015a).

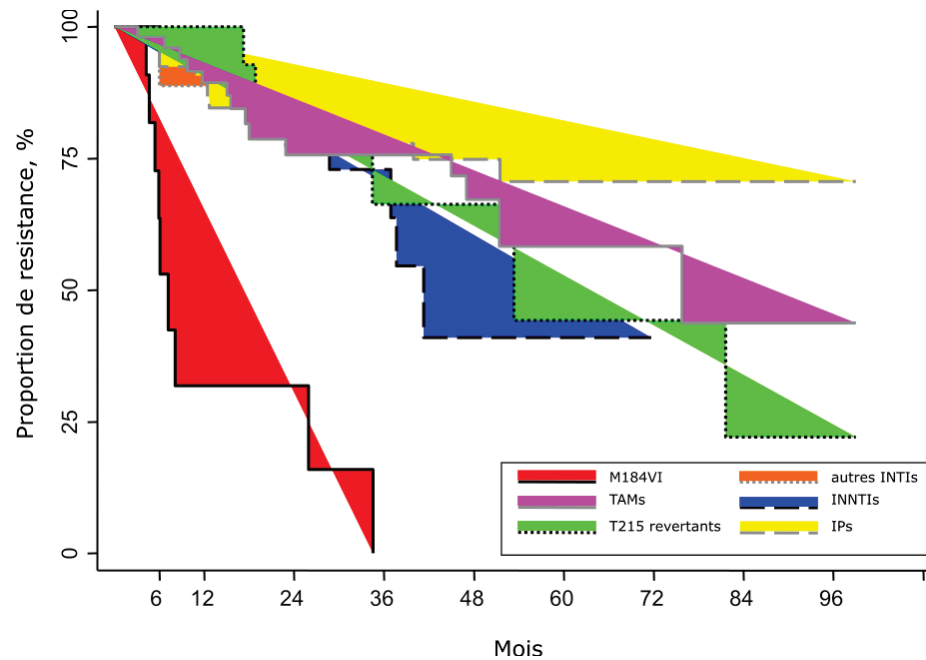


Figure 21. Persistance des mutations transmises chez des individus naïfs de TAR (modifié de Jain et al., 2011).

2.2.2 Mécanismes de résistance et mutations associées

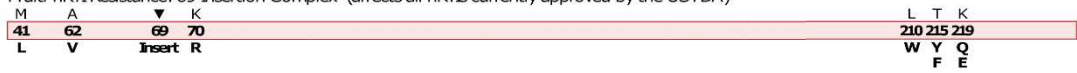
Dans cette partie, les mécanismes de résistance du VIH-1 aux principaux ARVs recommandés par l'OMS et utilisés dans les pays du Sud seront brièvement décrits, ainsi que les mutations de résistance cliniquement significatives les plus communes. On parle de **mutations majeures** pour décrire les mutations associées à une diminution importante de la sensibilité à certains ARVs, qu'elles soient seules ou en association avec d'autres mutations. En plus de ces mutations, il est possible d'observer des **mutations accessoires (ou mineures)** qui contribuent aussi à diminuer la sensibilité aux ARVs. La liste des mutations associées à la résistance de l'IAS (International AIDS Society) sert en général de référence au niveau international (**Figures 22**) (Wensing et al., 2015).

(a)

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)

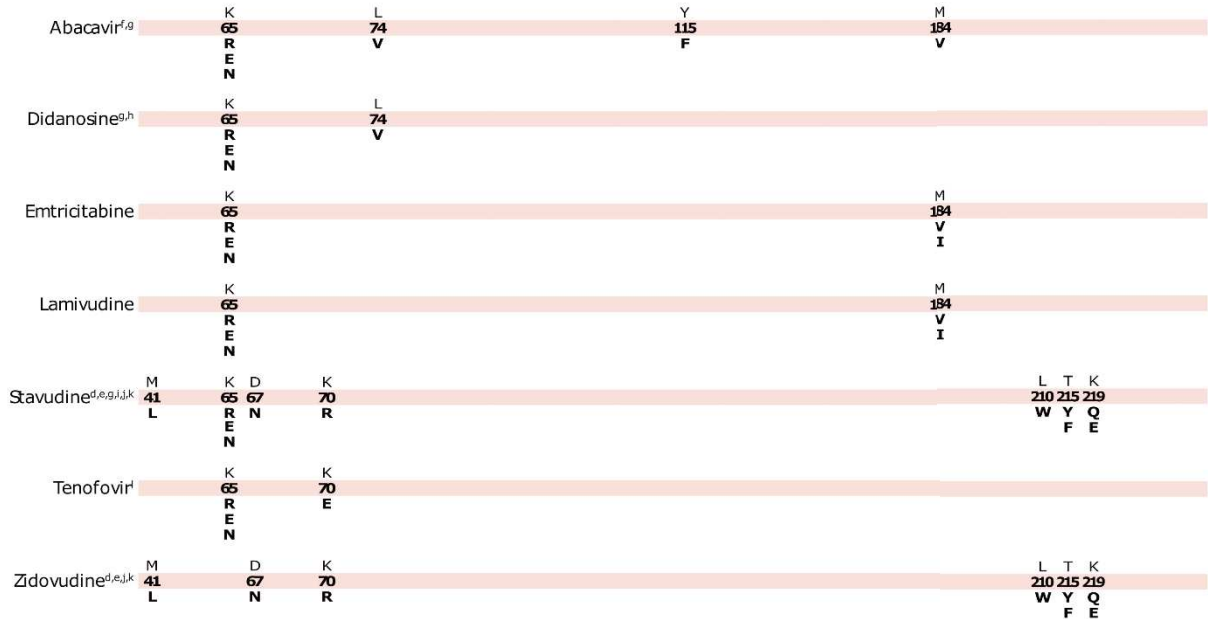
Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex⁶ (affects all nRTIs currently approved by the US FDA)



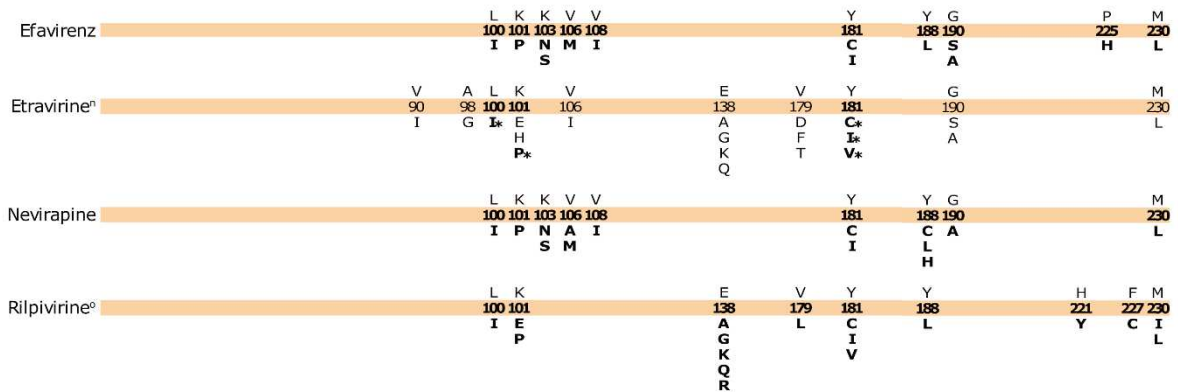
Multi-nRTI Resistance: 151 Complex⁷ (affects all nRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)



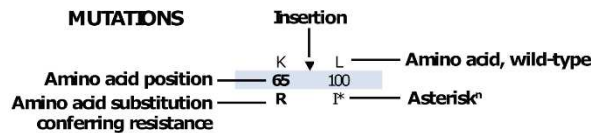
Multi-nRTI Resistance: Thymidine Analogue-Associated Mutations^{d,e} (TAMs; affect all nRTIs currently approved by the US FDA)



Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{8,m}



Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.



(b)

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS^{a,r}

Atazanavir +/- ritonavir ^s	L 10	G 16	K 20	L 24	V 32	L 33	E 34	M 36	M 46	G 48	I 50	F 53	I 54	D 60	I 62	I 64	A 71	G 73	V 82	I 84	I 85	N 88	L 90	I 93
	I F V C	E R I M I T V			I I Q V			I L V	I L V		L L Y V M T A			E V		L M V	V C S T T L A		A T F I	V V S			M L M	
Darunavir/ ritonavir ^s	V 11				V 32	L 33			I 47		I 50	I 54					T 74	L 76		I 84			L 89	
	I				I F			V	V	V	M L						P V		V	V			V	
Fosamprenavir/ ritonavir	L 10				V 32				M 46	I 47	I 50	I 54					G 73	L 76	V 82	I 84			L 90	
	F I R V				I			I V	V	V	L V M						S V		A F S T	V V			M	
Indinavir/ ritonavir ^u	L 10	K 20	L 24		V 32			M 36	M 46			I 54					A 71	L 73	V 76	V 77	I 82	I 84	L 90	
	I R V	M I R			I			I	I L		V	V					V S T A	V I	V I	A V	V		M	
Lopinavir/ ritonavir ^s	L 10	K 20	L 24		V 32	L 33		M 46	I 47	I 50	F 53	I 54		L 63			A 71	G 73	L 76	V 77	V 82	I 84	L 90	
	F I R V	M I R			I F			I V	L A	V L	V L A M T S			P			V S T	V	V	A F T S	V		M	
Nelfonavir ^{u,w}	L 10				D 30			M 36	M 46								A 71	V 77	V 82	I 84	N 88	L 90		
	F I				N			I	I L								V T	I	A F T S	V V	D S	M		
Saquinavir/ ritonavir ^u	L 10	L 24							G 48		I 54			I 62			A 71	G 73	V 77	V 82	I 84	L 90		
	I R V	I							V		V L			V			V S T	I	A F T S	V V		M		
Tipranavir/ ritonavir	L 10				L 33			M 36	K 43	M 46	I 47	I 54	Q 58				H 69	T 74	V 82	N 83	I 84	L 89		
	V				F			I L V	T	L V	A M V	A M V	E				K R	P	L T	D V		M V		

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS²

Dolutegravir ^{aa}									F 121	E 138	G 140	Q 148	N 155	R 263	
									Y	A K	A S	H R	H	K	
Elvitegravir ^{bb}		T 66			E 92			T 97	F 121			S 147	Q 148	N 155	R 263
		I A K			Q G			A	Y			G H K R	H	K	
Raltegravir ^{cc}			L 74		E 92			T 97	F 121	E 138	G 140	Y 143	Q 148	N 155	R 263
			M		Q			A	Y	A K	A S	R H C	H K R	H	K

Figure 22. Liste des mutations de résistance du VIH-1 aux ARVs référencées par l'IAS en 2015.

(a) Mutations de résistance aux INTIs et INNTIs, (b) Mutations de résistance aux IPs et aux INIs. Cette figure qui ne peut être ni modifiée, ni traduite est directement extraite de Wensing et al., 2015. Les notes ne pouvant pas être reproduites, elles sont à consulter sur l'article mais les éléments principaux sont rappelés dans la suite de ce chapitre.

2.2.2.1 Résistance aux INTIs

(1) Mutations « discriminantes » des INTIs

Les INTIs ne bloquent pas l'activité de la RT mais s'incorporent en tant que « *terminateurs de chaîne* » au cours de la polymérisation de l'ADN viral, comme nous l'avons brièvement expliqué (**paragraphe 2.2.1.1**). Le premier mécanisme de résistance aux INTIs implique des mutations qui diminuent leur taux d'incorporation (k_{pol}) au profit des dNTPs naturels, entraînant ainsi une augmentation de la réplication virale. Cette « voie discriminatoire » est principalement représentée par les mutations M184V/I et K65R, ainsi que les mutations K70E, L74V, Y115F, et le « complexe Q151M » (**Figures 22 & 23**) (Wensing et al., 2015).

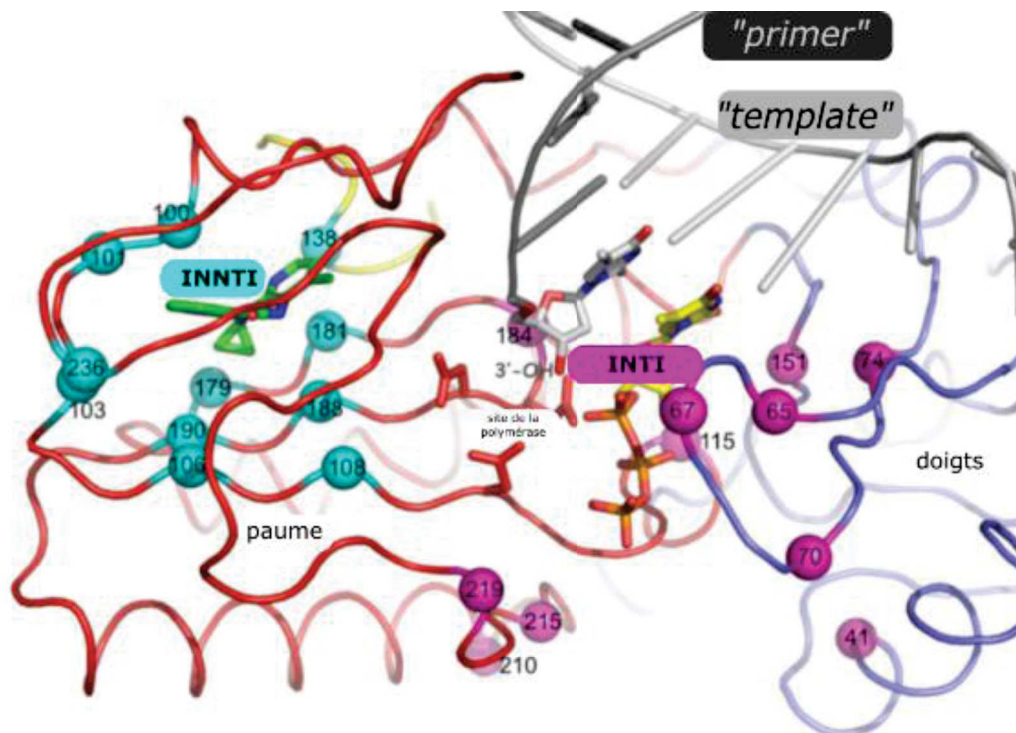


Figure 23. Mutations de résistance aux INTIs et INNTIs.

Les sites de mutation communément observés de de résistance aux INNTIs (bleu ciel) et aux INTIs (violet). La M184V est située au niveau du site de polymérisation de l'ADN proviral, formé par le motif des quatre acides aminés « YMDD » (Tyrosine, Méthionine, Acide aspartique, Acide aspartique) et situé dans l'espace entre la « paume », le « pouce » et les autres « doigts ».

Ces mutations peuvent effectivement diminuer l'affinité de liaison des INTIs-(bi)triphosphorylés (k_D), en créant par exemple un encombrement stérique au niveau du site actif de polymérisation de la RT (ex. M184VI). Elles peuvent aussi favoriser la liaison avec le

groupement 3'-OH du résidu osidique des dNTPs qui est absent des INTIs (ex. Q151M) (Iyidogan and Anderson, 2014; Menéndez-Arias, 2013). Elles peuvent également réduire directement le k_{pol} des INTIs en modifiant la conformation du site actif de la polymérase (ex. K65R).

➤ **La mutation M184VI** est sélectionnée par 3TC/FTC auxquels elle confère une forte résistance, en réduisant par plus de 100 fois leur sensibilité, en comparaison à une souche sauvage (Frost et al., 2000). Elle peut aussi diminuer la sensibilité à ABC et ddI lorsqu'elle est associée à d'autres mutations, générant ainsi des résistances croisées. Inversement, elle augmente la sensibilité au TDF et AZT/d4T, ce qui justifie le choix de conserver 3TC/FTC malgré la présence de virus porteurs de M184VI lorsqu'ils sont associés à TDF ou AZT, dans le TAR de 2^{ème} ligne dans les pays du Sud (Gallant, 2006) (WHO, 2016a).

La M184VI réduit également le taux d'incorporation (k_{pol}) des dNTPs naturels, surtout lorsqu'ils sont présents à de faibles concentrations, ce qui diminue le « *fitness* » du virus. Ainsi, la M184VI est associée à une baisse de 0,5 \log_{10} copies/mL de la charge virale de l'ARN du VIH-1, et à une diminution de la capacité de transmission du virus (Pingen et al., 2014b; Tang et Shafer, 2012; Winand et al., 2015). Elle persiste aussi rarement en l'absence de pression antirétrovirale (Castro et al., 2013; Jain et al., 2011). La M184I résulte d'une substitution nucléotidique plus commune que la M184V : elle émerge habituellement en premier puis elle est remplacée au bout de quelques semaines par la M184V (Frost et al., 2000). Enfin, la prévalence de M184VI semble significativement plus élevée chez les patients recevant un TAR à base de 3TC+TDF, plus souvent utilisé dans les pays du Sud, en comparaison à FTC+TDF (Marcelin et al., 2012).

➤ **La mutation K65R** est généralement sélectionnée par TDF, ainsi que par ABC, d4T et ddI, réduisant par 2 fois environ leur sensibilité (Garforth et al., 2014; Tang et al., 2013; Wensing et al., 2015)³. De plus, elle réduit d'environ 5 à 10 fois la sensibilité de 3TC/FTC. A l'inverse, elle augmente la sensibilité à l'AZT. La K65R est généralement sélectionnée plus rapidement chez les patients infectés par le VIH-1 C (Garforth et al., 2014; Villabona-Arenas et al., 2016).

³ <http://hivdb.stanford.edu/DR/NRTIResiNote.html#69Wainberg1999>, consulté le 20/06/16.

➤ **La mutation L74V/I** est principalement sélectionnée par ABC et ddI et réduit respectivement par 5 et 2 fois leur sensibilité, en association avec la M184V/I. A l'inverse, elle augmente la sensibilité à l'AZT³. En outre, elle est occasionnellement sélectionnée par TDF mais seule, elle est insuffisante pour diminuer sa sensibilité. Les mutations **Y115F** et **K70E** (rare), toutes les deux sélectionnées par ABC et TDF, réduisent uniquement la sensibilité à ABC (pour Y115F) et TDF (pour K70E).

➤ **La mutation Q151M** est généralement combinée à au moins deux mutations accessoires (A62V, V75I, F77L et F116Y). On parle ainsi de « complexe Q151M », qui confère une multi-résistance à tous les INTIs, à l'exception du TDF (Wensing et al., 2015). D'autres mutations, entre les positions 62 et 72, semblent associées à ce complexe (T69N, K70G/Q ou délétion en position 69) (Iyidogan et Anderson, 2014). La Q151M requiert deux changements nucléotidiques engendrant des formes intermédiaires (ex. Q151KL) : elle n'est donc pas fréquente et survient dans un contexte d'échec virologique prolongé (Menéndez-Arias, 2013).

(2) Mutation de « déblocage » de l'élongation ou mutations des analogues de la thymidine (TAMs)

L'autre mécanisme de résistance aux INTIs implique des mutations qui modifient la structure de la RT et favorisent l'excision nucléotidique de certains INTIs, en inversant le sens de la réaction de polymérisation (Arion et al., 1998; Meyer et al., 1998, 1999). Cette réaction de pyrophospholise utilise comme co-substrats l'ATP (adénosine triphosphate), ou plus rarement le PPi (pyrophosphate ou diphosphate inorganique). Grâce aux mutations, ils entrent plus facilement à proximité du site des INTIs incorporées sous forme monophosphatée, en 3' de l'ADN viral. La pyrophospholise va donc libérer les INTIs sous les formes respectives de dinucléoside tétraphosphate ou de nucléoside triphosphate, et permettre ainsi la restauration de la polymérisation de l'ADN viral. En outre, la réaction d'excision peut être bloquée par la translocation des dTNP naturels et INTIs avec l'ADN en un « complexe fermé ». Comme elles sont couramment sélectionnées par AZT et d4T, ces mutations sont souvent appelées « mutations des analogues de la thymidine » (TAMs, *thymidine analogue mutations* en anglais).

➤ **Les TAMs** confèrent la résistance à AZT et d4T, mais également des résistances croisées avec TDF, ABC et ddi. Classiquement, il existe huit TAMs présentes à six positions différentes sur le gène de la RT : M41L, D67N, K70R, L210W, 215Y/F et K219Q/E. Il existe deux profils d'acquisition des TAMs (1 et 2), qui sont distincts tout en pouvant se chevaucher. Comme TAM-1 (M41L, T215Y, et L210W) engendre un « coût de *fitness* » viral plus faible, il survient plus fréquemment et cause une résistance plus forte que TAM-2 (D67N, K70R, K219Q/E, et T215F) (Gopalakrishnan et al., 2014; Hu et al., 2006; Marcelin et al., 2004).

En présence de pression antirétrovirale, L210W et T215F améliorent *in vitro* le « *fitness* » des souches possédant respectivement M41L et T215Y (TAM-1) et D67N, K70R et K219Q/E (TAM-2) (Hu et al., 2006). En l'absence ou non de pression antirétrovirale, T215Y possède un meilleur « *fitness* » que T215F et serait plus facilement transmise. Toutefois, les patients infectés avec des souches contenant T215YF développent rapidement les formes révertantes T215ACDEGHILNSV.

Comparées aux souches ayant des mutations « discriminantes » (K65R, L74V), les souches résistantes contenant déjà plusieurs TAMs sont plus susceptibles de continuer à en développer d'autres. Ainsi, la présence de 4 à 5 TAMs associées à la M184V/I correspond au profil résistance à tous les INTIs le plus courant (Tang et Shafer, 2012). L'accumulation des TAMs est souvent rapportée chez les patients en échec virologique dans les pays du Sud et dans ce contexte, leur nombre augmente avec la durée de TAR (Cozzi-Lepri et al., 2009; Messou et al., 2013; Tang et Shafer, 2012; Tang et al., 2013; Villabona-Arenas et al., 2016). Par ailleurs, la présence de TAMs pourrait atténuer la sélection de K65R chez les VIH-1 C (Invernizzi et al., 2013; Wensing et al., 2015).

On peut également observer de nombreuses mutations accessoires (ex. E40F, E44D et V118I), en associations avec les TAMs, qui pourraient contribuer à réduire la sensibilité des INTIs³. Dans ce contexte, la **T69ins** (substitution T69S + insertion ≥ 2 acides aminés en position 69) peut survenir de façon rare, créant un complexe qui confère la résistance à tous les INTIs. A noter que les TAMs sont rarement sélectionnées chez les patients infectés par le VIH-2 chez lesquels on observe plus souvent les mutations « discriminantes » aux INTIs (M184V et Q151M) (Charpentier et al., 2014, 2015).

2.2.2.2 Résistance aux INNTIs

Le mécanisme de résistance aux INNTIs implique des mutations qui sont situées au niveau de leur site actif, dans la poche hydrophobe située à proximité du site de polymérisation de l'ADN (**Figures 22 & 23**) (Wensing et al., 2015). Ces mutations réduisent l'affinité des INNTIs à leur site actif ou elles leur en empêchent l'accès.

➤ Les mutations **K103NS**, **Y181CIV**, et **G190GSA** sont les plus communes, ainsi que **L100I**, **K101EP**, **V106AM**, **Y188CL** et **M230L**. La présence d'une seule de ces mutations majeures confère généralement la résistance aux INNTIs de 1^{ère} génération (EFV et NVP). A l'exception de K103NS et V106AM, elles réduisent aussi la sensibilité des INNTIs de 2^{ème} génération (ETR et RPV). Comparée aux INTIs et surtout aux IPs, la barrière génétique des INNTIs est plus faible, car une seule mutation suffit généralement à conférer une résistance à EFV/NVP et RPV. Bien que RPV et ETR aient une structure chimique similaire, la barrière génétique de l'ETR semble plus élevée. Comme ces mutations ont généralement peu d'impact sur le « *fitness* » viral, elles sont relativement bien transmises et persistent en l'absence de TAR (Castro et al., 2013; Jain et al., 2011). Il n'est donc pas recommandé de conserver EFV, NVP ou RPV en présence des mutations de résistance associées aux INNTIs.

➤ **La mutation E138K** peut être sélectionnée par RPV et ETR et semble réduire plus fortement la sensibilité de RPV lorsqu'elle est associée à M184VI. Toutefois, les mutations de cette position (E138AGKQ) représenteraient plutôt un polymorphisme génétique chez les VIH-1 non B (Abecasis et al., 2015). Par exemple, E138A est présente chez 5% des VIH-1 C⁴.

➤ **Les mutations en positions 181 et/ou 188 de la RT** sont présentes chez les VIH-2 et de nombreux VIH-1 O (60%), conférant ainsi une résistance naturelle à tous les INNTIs (Ren et al., 2002; Tebit et al., 2016).

2.2.2.3 Résistance aux IPs

Le mécanisme de résistance aux IPs implique généralement des mutations situées dans les régions naturellement conservées du site actif de la protéase (mutations majeures) ainsi que des mutations plus à distance (mutations accessoires) (**Figures 22 & 24**) (Wensing et al., 2015).

Les IPs sont des molécules à forte barrière génétique car ils nécessitent généralement d'accumuler plusieurs mutations de résistance pour voir diminuer significativement leur affinité de liaison avec le site actif de la protéase. Ainsi, la présence d'au moins 3 mutations est habituellement nécessaire pour conférer une résistance aux IPs les plus couramment utilisés (ATZ/r, LPV/r et DRV/r).

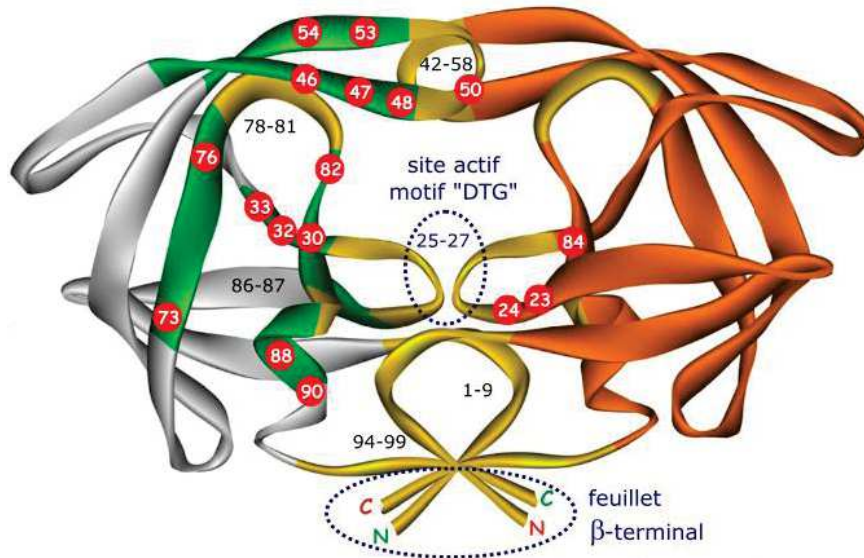


Figure 24. Structure de la protéase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux IPs.

La protéase est un homodimère constitué de 99 acides aminés. Les zones d'interface entre les dimères sont représentées par des pointillés bleus. C'est une aspartyl protéase qui contient un motif conservé « DTG » dans chaque sous-unité, correspondant à Asp²⁵-Thr²⁶-Gly²⁷, et qui représente le site actif de la protéase. En présence de pression antirétrovirale, on peut distinguer les régions hautement conservées (jaune et lettres bleues), les régions naturellement variables (gris) et les régions naturellement conservées où apparaissent les principales mutations de résistance (vert) (modifié d'après Louis et al., 2011; Menéndez-Arias, 2013).

➤ Les **mutations majeures** sont souvent sélectionnées en premier et concernent les 13 positions suivantes: D30N, V32I, L33F, M46IL, I47AV, G48VM, I50LV, I54VTALM, L76V, V82AFTSL, I84V, N88DS et L90M (**Figure 22 & 24**) (Wensing et al., 2015)³. Généralement, elles vont d'abord modifier les interactions de liaison entre les IPs et le site actif de la protéase, entraînant un réarrangement pour les ré-ajuster. Il en résulte une baisse de la capacité répliquative du virus. Même si certaines de ces mutations sont spécifiques d'un IP (ex. I50L pour ATZ), la plupart d'entre elles entraînent une résistance croisée aux autres molécules de la classe, d'autant plus forte que le nombre de mutations est élevé.

➤ Les **mutations accessoires** viennent ensuite s'accumuler pour améliorer le « *fitness* » viral et renforcer ainsi la résistance. Certaines d'entre-elles représentent communément des polymorphismes génétiques chez les VIH-1 non B (Vergne et al., 2000; Wensing et al., 2015).

2.2.2.4 Résistance aux INIs

Quatre positions principales de mutations majeures aux INIs de 1^{ère} génération (RAL et EVG), situées à proximité du site actif de l'intégrase, ont été décrites : **E92**, **G140**, **Q148** et **N155** (**Figure 22 & 25**) (Menéndez-Arias, 2013; Wensing et al., 2015). Située légèrement en dehors du site actif, la position **Y143** interagit aussi avec RAL.

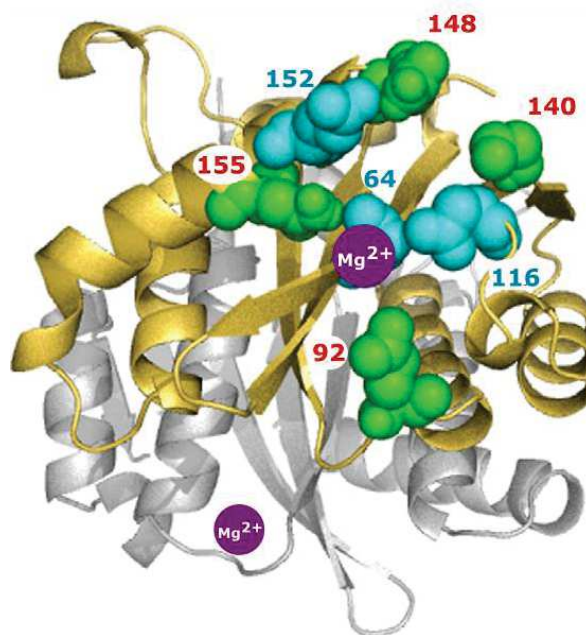


Figure 25. Structure du site actif de l'intégrase du VIH-1 et sites de mutation associés à une résistance aux INIs.

Le site actif de l'enzyme (acides aminés 50-212) contient notamment le motif « DDE » correspondant à Asp⁶⁴-Asp¹¹⁶-Glu¹⁵² (bleu) et les cations Mg²⁺ sont indiqués en violet. Les principales positions de mutations sont indiquées en rouge (modifié d'après Menéndez-Arias, 2013).

Il existe trois profils distincts d'acquisition de résistances avec RAL, définis par la présence d'une mutation majeure plus ou moins souvent accompagnée d'au moins une mutation accessoire : (1) « Voie **Q184** » (plus fréquente) inclut **Q148HKR** avec souvent **G140AS** et/ou **E138AK**, ou L74M parfois ; (2) « Voie **N155** » inclut **N155HST**, avec occasionnellement L74M, E92Q, T97A, G136R ou V151I ; (3) « Voie **Y143** » (plus rare) inclut **Y143CHR**, avec parfois L74AI, E92Q, I203M et S230R. Certaines mutations accessoires peuvent représenter des polymorphismes génétiques chez les VIH-1 non B (Monleau et al., 2012).

➤ **La mutation Q184HKR** réduit entre 5 et 100 fois la sensibilité de RAL/ELV si elle est seule, et de plus de 100 fois lorsqu'elle est associée avec G140SA. Cette association réduit aussi de 10 fois la sensibilité de DTG. La plupart des mutations associées au RAL sont croisées avec ELV, sauf la « voie Y143 » qui est plus rare. De plus, la mutation **E92Q** seule confère une plus forte résistance à ELV que RAL. Il existe aussi des mutations majeures qui sont spécifiques à ELV, comme **T66IAK** ou **S147G**. Le DTG possède une barrière génétique plus élevée que les molécules de 1^{ère} génération (RAL et ELV) et il semble possible de l'administrer chez des patients en échec virologique avec des souches résistantes à RAL/ELV (Castagna et al., 2014).

2.3 Analyse et interprétation de la résistance

2.3.1 Généralités sur les tests de résistance

L'analyse de la résistance du VIH aux ARVs se fait généralement avec des tests génotypiques et parfois phénotypiques. L'analyse phénotypique peut être réalisée soit avec un virus isolé des cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes TCD4 et monocytes/macrophages) (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells* en anglais), soit avec un virus recombinant dans lequel le gène cible (ex. *pol*) du patient a été inséré (Antivirogram®, Virco ; PhenoSens®, Monogram). Ces virus sont ensuite mis en culture avec différentes concentrations d'ARVs afin d'évaluer *in vitro* le degré d'inhibition de la réplication virale (Hertogs et al., 1998; Kellam et Larder, 1994). Les résultats sont exprimés par le rapport entre la CI₅₀ ou CI₉₀ (concentration inhibitrice 50% ou 90%) de la souche du patient et celle d'un isolat sensible de référence. Ces tests sont plus chers, plus complexes et plus longs à réaliser que les tests génotypiques et ils n'ont pas montré de bénéfice clinique supérieur pour la prise en charge des patients. Ils sont donc principalement utilisés pour évaluer la résistance à des nouveaux ARVs testés au cours d'essai cliniques.

L'analyse génotypique détecte les mutations de résistance en comparant les séquences de la souche du patient par rapport à celle d'une souche sensible de référence (ex. VIH-1 B HXB2 : K03455), dans les régions ciblées par les ARVs. Il s'agit généralement de l'ensemble de la protéase (codon 1 à 99) et d'une partie de la RT (codon 1-40 à 247-335) (gène *pol*) mais aussi en fonction du TAR, d'une partie de l'intégrase (codon 1 à 160) (gène *pol*) et de la gp41.

De plus, en cas de prescription de Maraviroc (antagoniste CCR5), un test de tropisme est réalisé afin de vérifier la présence d'un virus majoritaire utilisant le co-récepteur CCR5. Généralement, on fait un test génotypique qui analyse la séquence de la boucle V3 de la gp120 (gène *env*).

Le plasma est le prélèvement de référence pour réaliser le test génotypique afin d'amplifier l'ARN du VIH de la souche circulante chez le patient. Dans les pays du Sud le sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais) est aussi utilisé. Dans les pays du Nord, ce test est parfois réalisé sur l'ADN du VIH des PBMCs lorsqu'on souhaite déterminer le sous-type viral, détecter certains polymorphismes ou mutations de résistance « archivées » (qui ne sont pas forcément celles observées chez la souche circulante) chez des patients ayant une CV ARN plasmatique indétectable. La valeur prédictive positive des mutations de résistance dans l'ADN du VIH-1 est bonne, mais la valeur prédictive négative semble plus faible : l'absence de mutations de résistance « archivées » doit donc être interprétée avec prudence (Morlat 2015). Généralement, l'ARN du VIH est extrait à partir de 140 à 500 µL de plasma. Comme l'amplification est plus difficile dans les échantillons avec de faibles CV (< 1 000 copies/mL), on peut utiliser une prise d'essai d'1 mL et réaliser une ultracentrifugation pour concentrer l'ARN du VIH-1. La région ARN ciblée est rétro-transcrit en ADNc, qui est ensuite amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chain reaction* en anglais) grâce à une Taq polymérase, en deux ou une seule étape grâce à l'utilisation d'enzymes « one-step ».

Actuellement, le principal test génotypique de résistance commercialisé est ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 (Celera Diagnostics, CA, USA), approuvé par la FDA et mis au point sur les VIH-1 B (Eshleman et al., 2004). Il existe aussi le kit Trugene HIV-1 Genotyping (Siemens, Healthcare, NY, USA) (Grant et al., 2003; Jenabian et al., 2015), qui est contraignant à utiliser car l'électrophorèse est toujours réalisée sur un gel d'acrylamide, plutôt qu'avec un séquenceur automatique. Ces tests, mis au point pour les VIH-1 B, possèdent des logiciels d'édition et d'interprétation des séquences. Avec ViroSeq, des études menées sur les variants du VIH-1 circulant dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne (Cameroun, Gabon, RCA, Sénégal et Tchad) ont rapporté des taux d'échec importants (> 10-75%) chez 4 des 7 amorces de séquençage : A et D (sens, en 5' de la protéase), F (antisens, en 3' de la protéase) et H (antisens, en 3' de la RT) (Aghokeng et al., 2011; Mouafo et al., 2015; Thiam et al., 2013). Par conséquent, plusieurs tests « maison » ont été développés pour pouvoir séquencer correctement une large diversité de variants du VIH-1, dont celui du groupe AC11 de l'ANRS (www.hivfrenchresistance.org) (Aitken et al., 2013a; Inzaule et al., 2013; Manasa et al., 2014;

Monleau et al., 2014; Zhou et al., 2011). Ces tests sont généralement moins chers (Inzaule et al., 2016a). En Afrique du Sud, l'initiative ART-A (Affordable Resistance Test for Africa) a aussi permis le développement de tests « maison » plus spécifiquement adaptés au VIH-1 C, en utilisant des stratégies toujours favorables à la réduction du coût (diminution du nombre d'amorces de séquençage et des volumes de réactifs, simplification de la méthode PCR et amplification du fragment RT seulement) (Aitken et al., 2013a). D'autres tests « maison » existent pour séquençer les groupes divergents N, O et P (Villabona-Arenas et al., 2015).

Les tests génotypiques de résistance utilisent couramment le séquençage nucléotidique classique, basé sur la méthode de Sanger, est désormais automatisé grâce à des séquenceurs (Sanger et al., 1977). Cette technique donne la séquence consensus issue du produit de PCR. Les variants minoritaires ne peuvent être détectés que si leur prévalence dépasse 15 %, car en deçà les signaux de fluorescence qu'ils émettent sont masqués par ceux du produit majoritaire (Brenner, 2014). Principalement dédiée à la recherche, le NGS (*Next Generation Sequencing*, en anglais) est une technique de séquençage à haut débit qui permet de détecter tous les variants minoritaires présents dans un prélèvement. Différents appareils sont disponibles sur le marché mais ils continuent aussi d'être développés, notamment pour améliorer les longueurs de séquences générées qui sont actuellement comprises entre 75 et 400 pb. En plus de leur coût très élevé, le problème majeur de ces nouvelles technologies réside dans la quantité importante de données brutes générées, qu'il faut être capable d'en vérifier la qualité, de les analyser puis de les stocker. La présence indispensable d'un bio-informaticien pour les premières analyses, fait que la plupart des recherches produisant des séquences VIH s'effectuent sans NGS.

2.3.2 Interprétation des mutations de résistance

L'interprétation des tests génotypiques de résistance consiste à utiliser des algorithmes qui permettent de donner un sens clinique en prédisant le succès ou l'échec thérapeutique. Les algorithmes comparent la séquence obtenue à celle d'un virus de référence sensible. L'identification des mutations de résistance est notamment basée sur les critères suivants : **(1) les mutations *in vitro***, qui ont été sélectionnées au cours de mises en cultures répétées en présence d'ARV et dont l'introduction par mutagenèse dirigées dans une souche de référence confirme l'impact phénotypique, **(2) les mutations *in vivo*** observées à partir des données cliniques issues des essais thérapeutiques. Il existe trois algorithmes principaux pour interpréter les mutations de résistance d'une séquence du VIH-1 en niveau de résistance aux ARVs : **(1)**

ANRS, (2) Stanford HIVdb et (3) Rega Institute. Ces algorithmes sont enregistrés dans des logiciels disponibles en ligne gratuitement auxquels on soumet les séquences à analyser : <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput>.

Concernant l'interprétation de séquences de VIH-2, l'utilisation de l'algorithme GRADE (*Genotypic Resistance-algorithm DEutschland*, en anglais) est plus adapté : <http://www.hiv-grade.de/cms/grade/homepage/> (Charpentier et al., 2015).

Pour chaque molécule ARV, le résultat obtenu avec l'algorithme ANRS s'exprime en trois « niveaux de résistance » : Résistance (R), résistance Intermédiaire (I) et Sensible (S) ; en fonction des types ou associations de mutations observées. L'algorithme de Stanford ajoute deux niveaux intermédiaires supplémentaires (peu sensible et résistance faible). Il calcule un score total (0-60) à partir des différents scores attribués à chaque type de mutation, et en tenant compte aussi des associations de mutations possibles. Ainsi, les différences entre les algorithmes et les niveaux d'interprétation peuvent parfois conduire à des discordances de résultats sur certaines mutations de résistance, notamment chez les VIH-1 non B (Wagner et al., 2015). Régulièrement, les algorithmes sont mis à jour et proposent des nouvelles versions qui tiennent compte de l'évolution des connaissances. L'IAS (International AIDS Society) fait aussi une revue des publications traitant de la résistance du VIH pour actualiser la liste des mutations aux ARVs (**Figure 22**). Cette liste peut servir de référence au niveau internationale, mais elle ne fait pas office d'algorithme. Enfin, le Score Génotypique de Sensibilité (GSS) est parfois utilisé afin de simplifier l'interprétation des mutations. Il permet de représenter la somme des médicaments actifs présents dans un schéma thérapeutique, variant généralement entre 0 (aucun médicament actif) et 3 (Fofana et al., 2014; Jiamsakul et al., 2014).

En pratique, l'interprétation d'un test génotypique de résistance est à prendre avec précaution. Il faut d'abord s'assurer que le prélèvement ait bien été réalisé en présence d'un TAR optimal. Sinon, la ré-émergence de la souche sauvage sensible (phénomène de « re-sensibilisation ») peut conduire à une interprétation erronée du résultat. En cas d'interruption de TAR, le choix des nouveaux ARVs doit donc plutôt se baser sur un test génotypique de résistance réalisé au préalable. En cas de suivi virologique régulier, il est nécessaire de ré-interpréter les anciens tests de résistance avec la version actuelle de l'algorithme utilisé afin de pouvoir les comparer correctement au nouveau test. Compte-tenu de l'archivage des mutations, il est nécessaire d'interpréter les tests de résistance de façon cumulative. Enfin, pour une interprétation complète, le résultat du test de résistance doit être accompagné de l'identification du sous-type viral par analyse phylogénétique de la séquence de la RT.

Chapitre 3. Charge virale et sang séché sur papier buvard

3.1 Présentation générale

3.1.1 Définition

La charge virale (CV) VIH est définie par la concentration de particules virales ou pro-virales dans un compartiment spécifique de l'organisme. On l'évalue habituellement en quantifiant l'ARN, mais il est aussi possible de mesurer l'activité enzymatique de la RT ou l'antigène p24. La CV ARN plasmatique est directement corrélée au nombre de particules virales circulant dans ce compartiment. Elle est donc utilisée pour le suivi virologique de routine des patients car elle reflète la réplication active du VIH, qui est importante dans ce compartiment, et par conséquent l'évolution de l'infection (**Figure 7**) (Coombs et al., 1989; Harrigan, 1995; Ho et al., 1995; Mellors et al., 1996; Wei et al., 1995). Le prélèvement de référence pour réaliser la CV ARN est donc le plasma. D'autres alternatives sont actuellement proposées dans les pays du Sud, comme le sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais) (WHO, 2016a). Ce sujet est traité en **partie 3.3** de ce chapitre.

La CV ADN a une signification plus complexe car elle quantifie les pro-virus et les formes non intégrées, qui sont notamment présents dans les cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes TCD4 et monocytes/macrophages) (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell* en anglais) sous formes actives et latentes (réservoirs). Elle semble être un marqueur encore plus prédictif de l'évolution de l'infection que la CV ARN, à la fois chez les patients naïfs de TAR et à la fois chez ceux qui sont en succès virologique sous TAR (CV ARN VIH plasmatique indétectable) (Tsiara et al., 2012). En pratique clinique, elle est fréquemment utilisée comme test qualitatif dans le cadre du diagnostic précoce du VIH chez les nouveau-nés, qui est réalisé sur DBS dans les pays du Sud. Dans les pays du Nord, elle est parfois utilisée pour le suivi des patients en succès virologique sous TAR, en particulier lorsqu'il est envisagé un allègement thérapeutique (Alidjinou et al., 2015) (Morlat 2015).

La CV s'exprime sous forme arithmétique (copies/mL) ou logarithmique décimale (\log_{10} copies/mL) pour tenir compte à la fois de l'étendue des valeurs (allant de 20 à 10 millions de copies/mL, soit 1,3 à 7,0 \log_{10} copies/mL) mais aussi de leur variabilité. Cliniquement, une variation de CV est significative si elle est supérieure à 0,5 \log_{10} copies/mL (soit un facteur 3 en expression arithmétique) et elle est majeure si supérieure à 1,0 \log_{10} copies/mL (soit un facteur 10 en expression arithmétique). Ainsi, l'unité logarithmique minimise les variations de faibles amplitudes dont la signification clinique prête à discussion.

3.1.2 Méthodes immuno-enzymatiques

Les techniques de CV mesurent l'antigène p24 (HIV-1 p24 Ultra ELISA, PerkinElmer) ou l'activité de la RT (ExaVir™ Load v3.0, Cavid AB) utilisant les méthodes immuno-enzymatiques ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, en anglais). Simples et peu coûteuses, elles représentent de bonnes candidates pour les pays du Sud mais leur développement a rencontré des limites, plus ou moins bien surmontées. Ainsi, le test p24 quantifie surtout VIH-1 sous-type B et avec un seuil de détection élevé (~10 000 copies/mL, et son usage reste appliqué à la recherche (Bystryak et Acharya, 2016; Luft et al., 2011). Un autre problème du test p24 est lié à la formation de complexes immuns non spécifiques, plus fréquemment observés dans les pays du Sud que dans les pays du Nord (Kestens et al., 1991).

Concernant le test ExaVir™ Load v3.0, plusieurs améliorations (modification de la composition des tampons de lyse et de lavages, augmentation de la prise d'essai et du temps de réaction de la RT) ont permis d'augmenter son seuil de détection à 200 copies/mL (Greengrass et al., 2009; Malmsten et al., 2005). Brièvement, la RT est récupérée après la lyse des particules virales extraites à partir de 1 mL de plasma. Le lysat est ajouté à une matrice ARN liée à une phase solide, en présence des amorces et substrats de la RT. La quantité d'ADN synthétisé est mesurée par ELISA à partir d'une courbe standard de RT recombinante. La durée de réalisation de ce test est longue, notamment en raison des temps d'incubation importants. Actuellement, il est réalisé manuellement (30 échantillons/série, 5h de technique manuelle sur un total de 48h), et un test automatisé ZIVA™ (Cavid AB) est en cours de développement (UNITAID, 2015).

Comme la mesure de l'activité enzymatique de la RT est indépendante de la diversité génétique du VIH, le test ExaVir™ Load v3.0 a l'avantage de quantifier tous les types et sous-types viraux, notamment VIH-2 et VIH-1 groupe O (Braun et al., 2003; Gupta et al., 2016; Labbett et al., 2009; Padaki et al., 2015). Il aurait une sensibilité > 90% au seuil de 200 copies/mL et > 95% au seuil de 1 000 copies/mL, liée notamment à des mesures de CV légèrement inférieures (0,2-0,3 log₁₀ copies/mL), comparé au test de CV ARN Abbott Real-Time HIV-1 VL (Abbott Molecular, USA) (Gupta et al., 2016; Labbett et al., 2009). Le test ExaVir™ Load pourrait donc être utilisé pour le suivi virologique de patients sous TAR vivant dans les pays du Sud, où le seuil d'échec virologique est de 1 000 copies/mL (WHO, 2016a). Cependant, alors que la présence des INNTIs (qui se fixent sur la RT) ne semble pas affecter ses performances, l'impact des mutations de résistance au niveau de la RT (qui peuvent modifier le « *fitness* » viral) doit encore être étudié à plus grande échelle (Gupta et al., 2016).

3.1.3 Techniques moléculaires et enjeux de développement

3.1.3.1 Développement des techniques moléculaires

Les techniques moléculaires de CV mesurant les acides nucléiques sont apparues au milieu des années 1990. Elles étaient basées sur l'amplification de séquences ARN ou ADN, réalisée respectivement grâce aux méthodes de RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne) et NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification* en anglais), avec une quantification « en *point final* » (fin de réaction) par ELISA ou chimiluminescence (van Gemen et al., 1993; Mulder et al., 1994). D'autres techniques étaient basées sur l'amplification du signal, comme celle de l'ADN branché (bDNA, *branched DNA signal amplification* en anglais) (Coste et al., 1996; Pachl et al., 1995).

A partir de 2005, les méthodes de quantification « en *temps réel* » sont apparues, améliorant de façon importante la sensibilité des tests de CV. Leur principe est basé sur la détection continue d'une fluorescence émise tout au long de l'amplification, et de la quantification lors de la phase exponentielle de la réaction. Ces nouvelles méthodes ont aussi réduit les risques de contamination en phase de post-amplification qui existaient avec les méthodes de quantification « en *point final* ». De plus, l'augmentation des volumes de prise d'essai a permis d'améliorer la capacité de détection aux seuils actuels de 20-50 copies/ml. Au cours de ce développement, les fournisseurs des principaux tests commercialisés (Abbott, BioMérieux, Roche et Siemens) ont aussi automatisé les techniques, avec la possibilité d'inclure l'étape d'extraction, en vue d'augmenter les capacités de rendement (de Mendoza et al., 2005; Ruelle et al., 2009; Schumacher et al., 2007; Tang et al., 2007).

Une plateforme de CV est composée d'un système d'extraction des acides nucléiques et des systèmes d'amplification et de détection. Le développement de la polyvalence de certaines d'entre elles, permet désormais la détection et le suivi des co-infections à VIH et aussi des infections de patients non VIH, comme la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), les hépatites B et C (VHB et VHC) et les infections sexuellement transmissibles (IST) liées à *Chlamydia trachomatis*/ *Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG). Enfin, le développement de protocoles adaptés à l'utilisation de DBS représente désormais un enjeu important, en particulier dans les pays du Sud.

La PCR digitale est une autre méthode, plus précise et plus sensible que la PCR quantitative « *en temps réel* » (qPCR). Son principe est basé sur la partition de l'échantillon dans des milliers de micro-réacteurs distincts dans lesquels se déroulent ou non l'amplification et sur la quantification estimée avec la loi de Poisson (Vogelstein et Kinzler, 1999). Même si elle est de plus en plus utilisée dans les pays du Nord pour mesurer de très faibles valeurs de CV ARN et ADN, elle ne l'est pas en routine car elle est chère et difficile à mettre en application.

3.1.3.2 Techniques moléculaires et diversité génétique du VIH

La grande diversité génétique du VIH (**partie 1.3**) a représenté un enjeu majeur dans le développement des techniques moléculaires. Les premiers tests de CV ont été conçus pour détecter et quantifier le VIH-1 M groupe B qui, bien qu'il soit majoritaire dans les pays du Nord, représente seulement 10% environ des virus circulant dans le Monde (Hemelaar et al., 2011). Par conséquent, la détection et la quantification des VIH-1 non B n'étaient pas toujours correctes, engendrant une sous-estimation des valeurs de CV et même des résultats faussement négatifs (Amendola et al., 2002; Loussert-Ajaka et al., 1995; Swanson et al., 2005).

L'optimisation des sondes et des amorces, en ciblant des régions très conservées et partagées entre différents variants, permet désormais de détecter une plus large diversité de variants du VIH-1 M (A-J) et les groupes divergents N, O et P pour certains tests (Peeters et al., 2010). Des approches proposant des méthodes de « double-amplification » ciblant deux régions différentes des génomes des VIH ont aussi été développées (Avettand-Fenoel et al., 2014; Sizmann et al., 2010). Cependant, aucun test de CV commercialisé n'est parfait et il y a toujours quelques échantillons non détectés ou mal quantifiés qui peuvent engendrer des conséquences cliniques pour les patients (Mourez et al., 2015). Idéalement, chaque laboratoire devrait d'abord pouvoir comparer différentes plateformes de CV ou bien connaître la diversité génétique des VIH-1 circulant dans sa région afin de choisir celle qui est la plus adaptée. Il faudrait aussi pouvoir mettre en évidence d'éventuels problèmes de quantification en réalisant la CV sur deux plateformes différentes, surtout quand des différences sont observées entre les valeurs de CV et la clinique, voire parfois les CD4.

3.1.3.3 Techniques moléculaires et tests de CV « ouverts »

Parallèlement aux tests commerciaux, plus d'une quinzaine de tests maison dit « ouvert » de RT-PCR quantitative « *en temps réel* » (RT-qPCR) ont été mis au point. Leurs objectifs de développement étaient à la fois de s'adapter à la diversité génétique du VIH-1 mais également aux conditions programmatiques des pays du Sud, avec des coûts d'équipements et de réactifs qui étaient avantageux à cette période (Rouet et al., 2008). Parmi eux, le test Generic HIV Charge virale (Biocentric, Bandol, France), développé par l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA), est commercialisé depuis 2008 (Rouet et al., 2005, 2007). Il est actuellement utilisé dans plusieurs pays du Sud et mis en place dans quatre pays d'Afrique subsaharienne (Burundi, Cameroun, Côte d'Ivoire et Guinée) avec le programme OPP-ERA (Open Polyvalent Platforms - Era) d'UNITAID, dont l'un des objectifs est de renforcer et décentraliser l'accès à la CV dans ces pays. Actuellement, de nouveaux tests maison continuent d'être mis au point et développés par différentes équipes de recherches à travers le monde puisque la diversité génétique du VIH continue de poser des problèmes de sous-quantification (Aitken et al., 2013b; Kaur et al., 2014). Au laboratoire, un test ouvert et polyvalent a été développé. Il possède la caractéristique de détecter une large diversité de variants du VIH-1 et ces ancêtres, des SIVs de chimpanzés et de gorilles, à l'origine des 4 transmissions inter-espèces de VIH-1 M, N, O et P (Etienne et al., 2013).

Concernant la quantification du VIH-2, il existait uniquement des tests maison jusqu'à la commercialisation récente d'un test « ouvert » par Biocentric, en collaboration avec l'ANRS. Il se caractérise par une très faible limite de détection inférieure (LDI) : 10 copies/mL, avec une prise d'essai d'1mL de plasma (Avettand-Fenoel et al., 2014; Delarue et al., 2013; Ekouévi et al., 2015). Leur développement a dû tenir compte de la plus faible capacité répliquative du VIH-2 par rapport au VIH-1 : les patients infectés par le VIH-2 ont très fréquemment une CV < 1 000 copies/mL, même en l'absence de TAR. Il a dû aussi prendre en compte la plus grande diversité génétique des VIH-2, en palliant notamment les problèmes liés à la mauvaise détection et quantification du VIH-2 B. Certains SIVsmm de mangabés enfumés, à l'origine de la transmission inter-espèce du VIH-2, peuvent également être détectés avec ces tests maisons (Styer et al., 2013).

3.2 Plateformes de charge virale complexes

Les caractéristiques techniques de chaque système sont à l'origine de différences entre les plateformes de CV : volume de la prise d'essai, seuil de détection, domaine de linéarité, gène(s) cible(s), capacité de détection des types et sous-types viraux. Dans le cadre du suivi virologique, il est recommandé d'utiliser la même plateforme afin de pouvoir interpréter correctement les résultats de CV d'un même patient (Sollis et al., 2014).

3.2.1 Plateformes commerciales « fermées »

Les plateformes commerciales sont habituellement qualifiées de « fermées », dans le sens où les appareils d'extraction, d'amplification et de détection, ainsi que les systèmes d'analyse utilisés sont sélectionnés par le fournisseur. Le manipulateur ne peut pas modifier librement les protocoles et l'analyse des résultats des tests de CV est automatique. Elles répondent à des normes de qualité techniques qui sont certifiées par le marquage Conforme aux Exigences (CE) dans l'Union Européenne et/ou approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. De ce fait, elles contiennent notamment un contrôle interne (CI) qui est ajouté à l'échantillon avant le début de l'extraction. Le CI suit donc tout le processus technique allant de l'extraction jusqu'à la détection. Si le CI est détecté dans la plage de validité correspondante, l'échantillon qui lui est associé a été traité correctement. En dehors, cela peut être le signe d'un problème technique ayant empêché ou inhibé de la réaction ou provoqué une sur-quantification, et dans ce cas le test de CV de l'échantillon associé ne peut être validé.

Dans ce chapitre, sont développées les 3 principales plateformes de CV commerciales « fermées », qui sont les plus couramment utilisées en routine sur plasma et les plus avancées dans le développement de protocoles sur DBS : **(1) Abbott Real-Time HIV-1 VL** (Abbott molecular, IL, USA), aussi utilisée au cours des travaux de thèse, **(2) Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0** (Roche Molecular Systems), **(3) NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0** (BioMérieux Clinical Diagnostics) (**Figure 23**). Après une brève présentation technique de chaque plateforme, la comparaison de leurs performances sera décrite d'abord sur plasma, et ensuite sur DBS dans la **partie 3.3**.

Les autres plateformes commerciales « fermées » actuellement disponibles proposent généralement des protocoles sur plasma uniquement, avec des systèmes d'amplification des acides nucléiques basés sur la RT-qPCR comme Versant® HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) (Siemens) (Ruelle et al., 2009; Troppan et al., 2009), ainsi que les nouveaux tests artus™ HIV-1 QS-RGQ (Qiagen) (Drexler et al., 2012; Garcia-Diaz et al., 2013; Hopkins et al., 2015), et Veris MDx (Beckman Coulter) (Sauné et al., 2015). Il existe aussi un nouveau test Aptima® HIV-1 Quant Dx assay (Hologic) dont l'amplification basée sur la RT-TMA (*transcription-based nucleic acid amplification*) vise à amplifier l'ARN dans des conditions isothermes, similairement à la méthode NASBA (Amendola et al., 2016; Hopkins et al., 2015; Mor et al., 2015; Nair et al., 2016).

3.2.1.1 Abbott Real-Time HIV-1 VL (Abbott molecular, USA, IL)

Abbott est le fournisseur des tests de RT-PCR quantitative (Real-Time HIV-1 VL) et qualitative (Real-Time HIV-1 assay), qui sont respectivement utilisés pour le suivi des patients sous TAR et le diagnostic précoce du VIH sur DBS chez les nouveaux-nés. En fonction des capacités de rendement des laboratoires, Abbott propose un système d'extraction manuel ou des systèmes automatisés (*m24sp* et *m2000sp*), couplés au système d'amplification et de détection *m2000rt* (**Tableau 1**).

Les amorces VIH-1 (ou *primer* en anglais) amplifient une courte séquence de 172 nucléotides (nt) située dans la région intégrase du gène *pol*, qui est hautement conservée (Tang et al., 2007). Concernant la détection du VIH-1, une sonde fluorescente partiellement double brin est utilisée, marquée en 5' par le fluorophore FAM™ (6-carboxyfluorescéine) (**Figure 26**). Quand la fluorescence est supérieure au bruit de fond, le nombre de cycles d'amplification (Ct) est enregistré en vue de réaliser la quantification à partir de la courbe de standards. Ainsi, le Ct au cours duquel le signal fluorescent est détecté est proportionnel au \log_{10} de la concentration ARN du VIH-1. Concernant le contrôle interne (CI), sa séquence cible (136 nt) est dérivée du gène HPR (hydroxypyruvate réductase) provenant de la citrouille (*Curcubita pepo*), et elle se trouve dans une particule d'ARN encapsulé diluée dans du plasma humain négatif. La sonde du CI est un oligonucléotide ADN simple brin marqué en 5' par le fluorophore VIC® et en 3' par le quencher BHQ1.

La plateforme Abbott détecte la majorité des variants du VIH-1 M, les sous-types A-H et les CRFs comme CRF01_AE et CRF02_AG, et aussi les groupes divergents N et O ; dans un domaine de linéarité allant de 40 à 10^7 copies/mL avec le test Abbott Real-Time HIV-1 VL (Tableau 1). Ce test détecte aussi le VIH-1 groupe P (Plantier et al., 2009; Sire et al., 2011). Généralement, la limite de détection inférieure (LDI) est définie comme la concentration d'ARN VIH détectée avec une probabilité $\geq 95\%$. La LDI du test Abbott Real-Time HIV-1 VL varie entre 40 et 150 copies/mL, en fonction de la prise d'essai respective de 600 et 200 μL . En routine, on utilise généralement 600 μL de plasma, correspondant à un seuil de détection inférieur de 40 copies/mL.

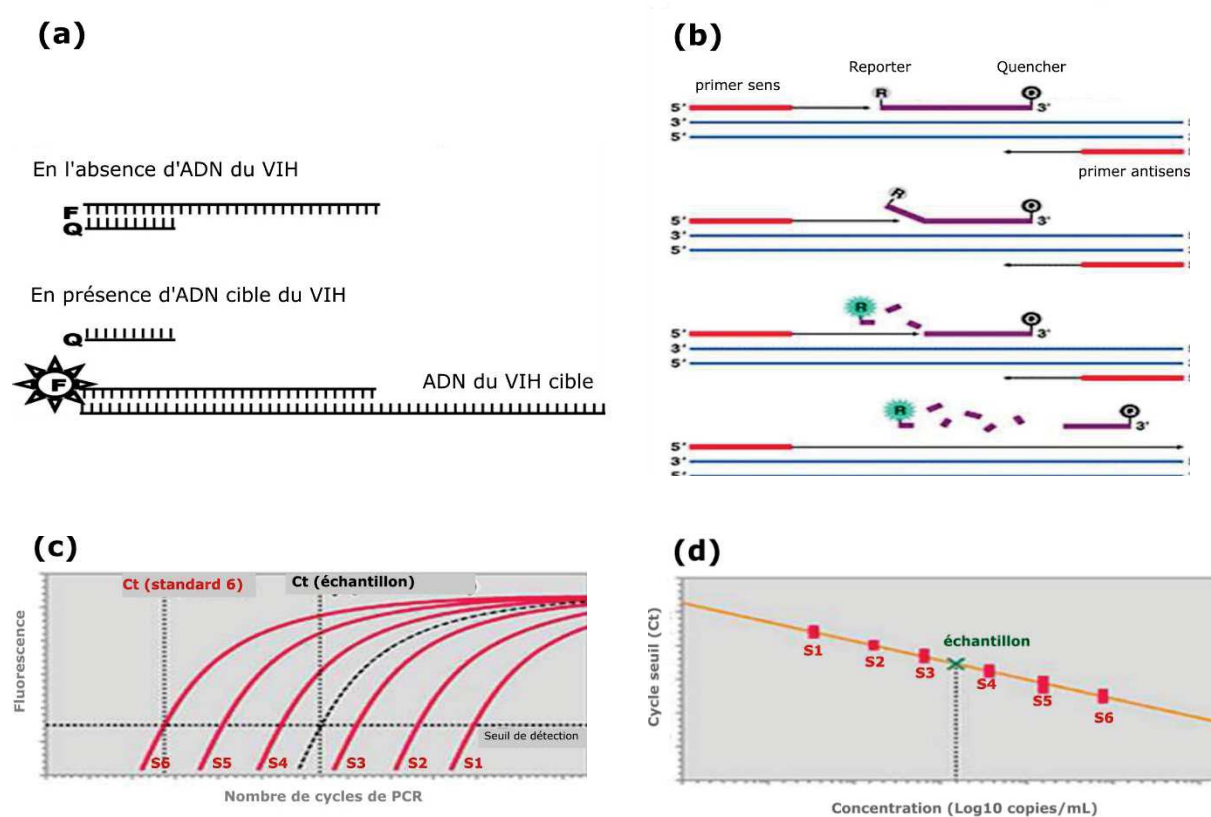


Figure 26. Présentation schématique de certaines sondes utilisées dans les techniques de RT-qPCR et principes d'amplification de quantification :

(a) Sonde partiellement double brin, avec test Abbott Real-Time HIV-1 VL (Abbott) : elle est marquée par le fluorophore FAMTM (6-carboxyfluorescéine) en 5' (F). Un court oligonucléotide est complémentaire de la sonde en 5', et il est marqué en 3' par une molécule qui désactive la fluorescence (Q, *quencher* en anglais) BHQ1TM (Black Hole Quencher 1), grâce au système de transfert d'énergie entre les molécules fluorescentes (FRET). En présence de la séquence cible de VIH-1, la sonde s'hybride préférentiellement avec celle-ci et se dissocie du quencher, ce qui permet l'émission de la fluorescence. **(b) Sonde Taqman®, avec le test Cobas® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 (Roche) :** courte séquence d'ADN (25-30 nt) marquée par un fluorophore (R, *reporter* en anglais) en 5' et un quencher en 3' et qui est complémentaire à la séquence cible de VIH-1. Lors de l'amplification, la Taq polymérase va cliver par hydrolyse la sonde en élongeant le primer (grâce à son activité exonucléasique 5'-3') et permettre l'émission de la fluorescence en dissociant le fluorophore du quencher. **(c) Courbes d'amplification exponentielle par RT-PCR.** **(d) Courbe de standards,** servant à réaliser la quantification (modifié d'après Tang et al., 2007; Wang et al., 2010).

3.2.1.2 Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 (Roche Molecular Systems)

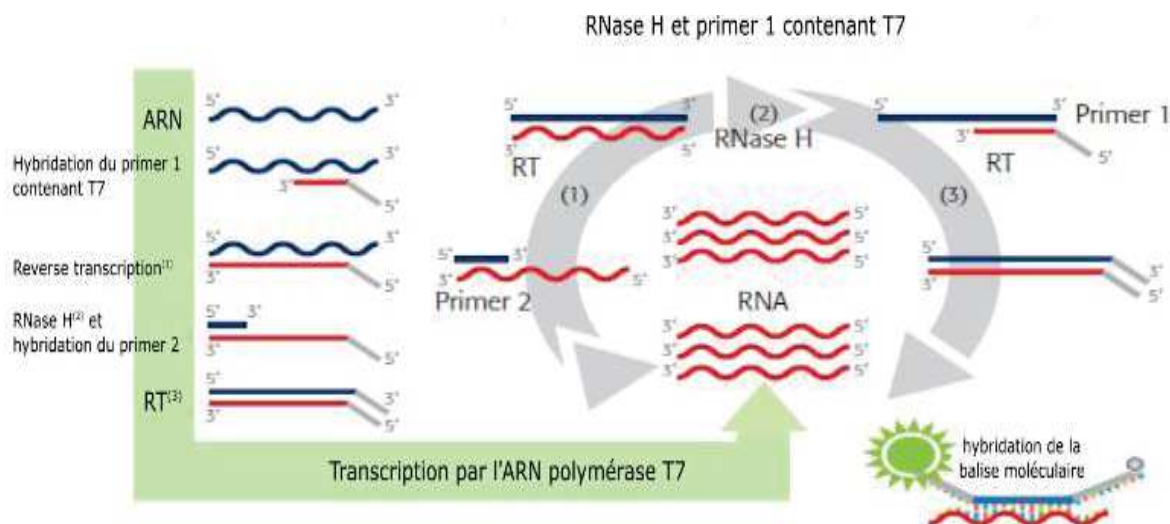
Roche est le fournisseur des tests de RT-PCR quantitatif (Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0) et qualitatif (Cobas® TaqMan® HIV-1 Qualitative v2.0). Le système d'extraction est entièrement automatisé avec AmpliPrep®. En fonction des capacités de rendement des laboratoires, il y a deux systèmes d'amplification et de détection, Cobas® TaqMan® 48 (relativement compact) et 96. Depuis 2014, Roche propose aussi les plateformes entièrement automatisées Cobas® 6800 et 8 800, qui ont intégré tous les systèmes dans un bloc et qui peuvent réaliser jusqu'à plus de 900 tests/jour.

Le test Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 partage les mêmes principes de détection et d'amplification qu'Abbott avec toutefois des différences, notamment au niveau de la sonde et des séquences ciblées. La première version (v1.0), qui amplifiait une région hautement conservée du gène *gag* p24, détectait et quantifiait moins bien certains variants, comme le CRF02_AG, et pas le VIH-1 O (Gueudin et al., 2007). La dernière version (v2.0) a conservé cette cible mais elle amplifie aussi une autre région hautement conservée dans 5' LTR. Grâce à cette stratégie « double-cible », Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 détecte désormais les variants du VIH-1 M (A-H), dont le CRF01_AE, et les groupes divergents N, O et P, dans un domaine de linéarité allant de 20 à 10⁷ copies/mL (Bourlet et al., 2011; Scott et al., 2009; Sire et al., 2011; Sizmann et al., 2010). Avec une prise d'essai nécessairement égale à 1 mL, ce test possède actuellement la meilleure limite de détection inférieure de 20 copies/mL. Ce volume important peut représenter toutefois une contrainte, notamment chez les enfants. Dans ce cas il semble possible d'utiliser une quantité plus faible de plasma (~200 µL) diluée dans du tampon phosphate salin (PBS, *phosphate buffered saline* en anglais), augmentant par conséquent la LDI (Mine et al., 2013).

3.2.1.3 NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 (BioMérieux, Craponne, France)

BioMérieux est le fournisseur d'un test de CV basé sur la méthode NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification* en anglais) qui amplifie une séquence *gag* p24 (461 nt) de l'ARN du VIH-1 dans des conditions isothermes à 41°C (NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0) (**Figure 27**) (Compton, 1991). L'extraction basée sur la technologie de Boom est semi-automatisée (miniMAG®) ou automatisée (EasyMAG®) (Boom et al., 1990).

Le système d'amplification et de détection est l'EasyQ®. La sonde qu'il utilise est une balise moléculaire (*molecular beacon* en anglais), formée d'un brin d'ADN en épingle à cheveux possédant un fluorophore en 5' et un quencher en 3'. En s'hybridant à l'ARN cible du VIH, elle change de conformation en s'ouvrant et en éloignant le quencher du fluorochrome, ce qui permet l'émission de la fluorescence.



(1) synthèse ADNc, (2) dégradation de l'ARN, (3) synthèse ADN

Figure 27. Principe de l'amplification isotherme de l'ARN avec la méthode NASBA.

Dans la phase non-cyclique, le primer antisens contenant une séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 se lie à la séquence cible de l'ARN du VIH, qui est transcrite en ADNc grâce à la RT. Une RNase H élimine ensuite l'ARN pour permettre au primer sens de se lier à l'ADNc. Ce dernier est transcrit à son tour par la RT, formant ainsi un ADNc double brin porteur d'une séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 en 5'. L'ARN polymérase T7 va reconnaître cette séquence et transcrire une centaine de copies d'ARN antisens du VIH. L'ARN polymérase T7 va reconnaître cette séquence et transcrire une centaine de copies d'ARN antisens du VIH, qui vont aussi être utilisées directement par le primer sens pour la production d'ARN du VIH dans une phase cyclique (modifié d'après UNITAID, 2015).

Le test NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 détecte les VIH-1 M (A-J), dans un domaine de linéarité de 25 à 10^7 copies/mL. La LDI varie entre 25 et 150 copies/mL, en fonction de la prise d'essai respective de 1 000 et 200 μ L. Alors qu'elle a déjà pu quantifier correctement le VIH-1 N, ce test ne détecte et ne quantifie pas correctement les VIH-1 O et P (Mourez et al., 2015). De plus, certains sous-types (ex. VIH-1 G) et plusieurs recombinants (ex. CRF01_AE, CRF02_AG, CRF08_BC) ne sont quantifiés correctement (Gomes et al., 2013; Mor et al., 2015; Mouinga-Ondémé et al., 2014; Ndiaye et al., 2015; Tatarelli et al., 2016; Xu et al., 2012).

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des principales plateformes de charge virale commerciales « fermées » présentées dans ce chapitre.

Plateforme (fournisseur)	Extraction (nb d'échantillon par série/ min)	Amplification/ Détection (nb d'échantillon par série/ min)	LDI (prise d'essai en µL)	Gène cible	Virus VIH-1 M (A-H), autres	Autres agents pathogènes
Real-Time HIV-1 VL (Abbott)	Manuel (24/ 270 min)	<i>m2000rt</i> (24-96/ 180 min)	40-150 (1 000-200)	<i>pol</i> (intégrase)	Oui N, O et P ^(a) CRF01_AE CRF02_AG nombreux autres variants	CT/NG, VHC, VHB, HPV, MTB
	<i>m24sp</i> (24/ 150 min)					
	<i>m2000sp</i> (96 max/ 280 min)					
Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 (Roche)	Ampliprep® (24/120 min, 3 séries max en parallèle => 72 échantillons en 300 min env.)	Cobas® TaqMan® 48 (6-48/ 90-120 min)	20 (1 000)	<i>gag p24</i> + LTR (double-cible)	Oui N, O et P ^(a) CRF01_AE nombreux autres variants	VHC, VHB
		Cobas® TaqMan® 96 (96 max/ 180 min)				
Cobas® 6 800/ 8 800 (Roche)	6 800 (96/210 min => 384 échantillons/jour (8h) 8 800 => 960 échantillons/jour (8h)		13.2-35.5 (500-200)			
NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 (Biomérieux)	Minimag® (12-24/ 40-60 min)	EasQ® (24-48/ 60 min)	25- 50 (1 000- 500)	<i>gag p24</i>	Oui VIH-1 J	
	Easymag® (24/40 min)					

^(a)d'après (Sire et al., 2011). LDI : limite de détection inférieure ; CT/NG : *Chlamydia trachomatis*/ *Neisseria gonorrhoeae* ; VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C ; MTB : *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2.1.4 Comparaison des tests de CV Abbott Real-Time HIV-1 VL, Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 et NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 pour la quantification plasmatique des VIH-1

Pour comparer quantitativement deux tests de CV (ou techniques), on mesure l'intensité de la relation linéaire entre les deux variables quantitatives, en calculant le coefficient de corrélation de Pearson (r). On mesure aussi la concordance avec la méthode de Bland-Altman, qui permet d'analyser l'écart existant au sein de couples de valeurs quantifiables et de mesurer la différence moyenne (ou biais) (d) entre deux tests (Bland et Altman, 1995, 1999). Les résultats de ces analyses sont souvent présentés sous forme de graphique. Le Bland-Altman est l'outil le plus adapté pour donner une appréciation clinique concernant la comparaison d'un nouveau test de CV par rapport à un test de référence.

De façon générale, les tests de CV Abbott Real-Time HIV-1 VL (Abbott) et Cobas® TaqMan® HIV-1 v2.0 (Cobas) sont les plus concordantes, surtout au seuil de 1 000 copies/mL, correspondant au seuil d'échec virologique recommandé dans les pays du Sud (Bourlet et al., 2011; Ndiaye et al., 2015; Sire et al., 2011). Toutefois, cette concordance inter-essai diminue

dans les très faibles CV (≤ 200 copies/mL), car la précision, la reproductibilité et la sensibilité intrinsèque de chaque test de CV demeurent plus faibles aux extrémités inférieures de leur domaine de linéarité (Lalama et al., 2015; Margariti et al., 2016; Ruelle et al., 2012; Swenson et al., 2014). C'est une raison qui explique notamment pourquoi le seuil d'échec virologique est généralement fixé à 200 copies/mL dans les pays du Nord, car en deçà, la signification clinique peut être difficilement interprétable. Actuellement, la plateforme Cobas, qui possède la plus faible limite de détection inférieure (20 copies/mL) est légèrement plus sensible (Mourez et al., 2015).

Le test Cobas a tendance à avoir des valeurs de CV légèrement plus élevées que le test Abbott, avec une différence qui pourrait être supérieure à $0,5 \log_{10}$ copies/mL dans 20% des cas (Sire et al., 2011; Sollis et al., 2014). Cette tendance, qui pourrait être due à l'amplification des deux cibles *gag* p24 et LTR, n'a pas été retrouvée pour les CRF02_AG (Bourlet et al., 2011; Diouara et al., 2014a). Les tests Abbott et Cobas sont capables de détecter les groupes divergents O et P, mais il semble qu'Abbott quantifie mieux le groupe O, avec une différence supérieure à $0,5 \log_{10}$ copies/mL estimée à plus de 30% sur un panel d'une quinzaine d'échantillons (Mourez et al., 2015). Cependant, même avec Abbott, des faux-négatifs ont été observés en comparaison avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, qui a été récemment développé au laboratoire (Etienne et al., 2013).

Concernant la plateforme NucliSENS, des résultats faux-négatifs ou des problèmes de sous-quantification importante des VIH-1 non B ont souvent été reportés avec les anciennes versions (Amendola et al., 2002; Bourlet et al., 2011; Church et al., 2011; Swanson et al., 2005). Malgré une meilleure détection et quantification des VIH-1 non B avec la nouvelle version v2.0, on observe toujours des résultats divergents par rapport aux plateformes Abbott et Cobas, avec notamment une dispersion importante des valeurs, qui serait liée à la plus grande variabilité intragène de *gag* p24 par rapport au gène *integrase* (Abbott) et à la double-cible (*gag* et LTR) pour Roche (Mourez et al., 2015). Avec le test NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0, il semble que certains sous-types (comme VIH-1 G) ou recombinants (comme CRF02_AG circulant en Afrique de l'Ouest et Centrale mais aussi CRF01_AE et CRF08_BC circulant en Asie), ne soient pas correctement quantifiés (Gomes et al., 2013; Mor et al., 2015; Mouinga-Ondémé et al., 2014; Ndiaye et al., 2015; Tatarelli et al., 2016; Xu et al., 2012). Par contre, le test semble quantifier correctement les sous-types B et C (Mor et al., 2015; Muenchhoff et al., 2014).

3.2.2 Plateformes de charge virale « ouvertes »

Les plateformes « ouvertes » sont composées de divers systèmes d'extractions manuels et automatisés (Qiagen QIAmp® viral RNA minikit ou Qiacube®, Biomérieux NucliSENS miniMag® ou EasyMag®, Arrow...) et de différents thermocycleurs pour RT-qPCR (Bio-Rad CFX96, Applied biosystem 7500 et autres versions...), selon le choix des laboratoires. Malgré une technologie aussi complexe que les plateformes commerciales « fermées », elles présentent des avantages à être utilisées dans les laboratoires de référence des pays du Sud. Sur ces plateformes, il est effectivement possible de développer des tests de CV maisons adaptés à la diversité génétique du VIH-1 circulant dans chaque région du monde. Elles permettent aussi une flexibilité d'utilisation et d'amélioration des protocoles qui peut être intéressante dans le cadre de la recherche. Elles sont aussi qualifiées de « polyvalentes » car elles peuvent être aussi utilisées pour détecter et quantifier de nombreux autres micro-organismes que le VIH, en vue d'autres applications. Avec la tendance à la baisse des tests commerciaux, les tests de CV VIH « ouverts » ne représentent parfois plus d'avantage économique.

Dans ce chapitre, nous avons choisi de présenter brièvement deux tests de CV par RT-qPCR ouverts et polyvalents développés pour détecter une plus large diversité de variants du VIH circulant dans les pays du Sud : **(1) Generic HIV CV** (Biocentric, Bandol, France) commercialisé et mis en place dans certains pays du Sud ; **(2) RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor** récemment développé au laboratoire et étudié au cours de cette thèse. Ces deux tests ciblent une courte séquence (120 nt) dans la région hautement conservée des LTRs et utilisent une sonde TaqMan® (15 nt) marquée par le fluorophore FAMTM en 5' et le quencher MGB (*minor groove binder* en anglais) en 3' (Applied Biosystem, CA, USA).

3.2.2.1 Generic HIV charge virale (Biocentric, Bandol, France)

En 2004, le test Generic HIV CV (Biocentric, Bandol, France), mis au point par le groupe AC11 de l'ANRS en France, a été transféré et évalué avec succès en Côte d'Ivoire où prédomine des CRF02_AG (Rouet et al., 2005). Toutefois, ce test de 1^{ère} génération ne détectait pas certaines souches circulant au Cameroun ou en Thaïlande. Il a donc été rapidement optimisé pour détecter aussi ces variants, en proposant : (1) nouvelle sonde plus courte possédant le quencher MGB, afin de limiter les mésappariements assez fréquents liés à la diversité génétique du VIH (Afonina et al., 1997), (2) séquence d'amorce sens raccourcie de quelques nucléotides, (3) modification de la composition du « mix » d'amplification.

En 2007, le test de 2^{ème} génération a été évalué sur presque 900 plasmas de 10 pays différents (Argentine, Cambodge, Cameroun, Côte d'Ivoire, France, Madagascar, Maroc, RCA, Thaïlande et Zimbabwe), correspondant à environ 50% de VIH-1 non B parmi les 500 échantillons de sous-type connus (Rouet et al., 2007). Les résultats ont montré une meilleure quantification de la majorité des VIH-1 non B et des CRFs, ainsi que des VIH-1 B, comparé aux deux principaux tests commercialisés à cette époque mais qui ne sont désormais plus disponibles sur le marché, bDNA Versant 3.0 (Bayer) et Amplicor v1.5 (Roche). Le test a aussi été évalué avec succès sur des variants circulant dans d'autres pays (Allemagne, Brésil, Burkina-Faso, Kenya, Inde et Afrique du Sud) (Drosten et al., 2006; Rouet et al., 2010; Steegen et al., 2007). Finalement, ce test « ouvert » et polyvalent a été commercialisé en 2008 par Biocentric (Bandol, France) pour être utilisé dans le cadre du suivi virologique des patients sous TAR vivant notamment dans les pays du Sud où circule une large diversité génétique de VIH-1 (Rouet et al., 2008).

Plus récemment, le test Generic HIV CV (Biocentric) a de nouveau montré de bonnes capacités de détection et de quantification des différents variants du VIH-1, en comparaison avec les versions actuelles des principaux tests commerciaux « fermés » (Abbott, Cobas et NucliSENS) (Mouinga-Ondémé et al., 2014; Ndiaye et al., 2015). De plus, ces deux études menées au Gabon et au Sénégal ont montré qu'il avait tendance à voir des valeurs de CV légèrement supérieures ou égales à Abbott, égales à Cobas et inférieures ou égales à NucliSENS. Enfin, le test Biocentric vient d'être amélioré en 2015, avec une nouvelle version disposant d'un contrôle interne, comme dans les tests commerciaux « fermés ».

Au final, le test Biocentric détecte le VIH-1 M (A-H), dont les CRF02_AG et CRF01_AE, dans un domaine de linéarité pouvant varier en fonction des plateformes utilisées. Avec le système d'extraction automatisé Arrow, le domaine de linéarité est compris entre 165 à 5.10^6 copies/mL, pour une prise d'essai de 250 μ L extraite avec et un volume d'élution de 50 μ L. Dans ces conditions, la limite de détection inférieure est d'environ 400 copies/mL. Le test Biocentric quantifie mal ou ne détecte pas les groupes divergents N, O et P du VIH-1. De plus, certains variants du VIH-1 M n'arrivent toujours pas à être détectés, ni avec Biocentric, ni avec Abbott (Mouinga-Ondémé et al., 2014).

3.2.2.2 RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor

En 2013, le test ouvert et polyvalent universel RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor a été mis au point et évalué au laboratoire UMI233 TransVIH-MI de Montpellier en France (Etienne et al., 2013). La sonde et les amorces ont été élaborées à partir d'un alignement de séquences comprenant de nombreux sous-types et CRFs du VIH-1 M, ainsi que toutes les séquences disponibles des groupes divergents N, O et P, et aussi des séquences des virus divergents SIVcpz-*Ptt* et SIVcpz-*Pts* infectant les chimpanzés et SIVgor infectant les gorilles. Finalement, les amorces amplifient la même région LTRs (120 nt) que le test Biocentric, avec une amorce sens identique à l'exception des deux derniers nucléotides qui sont dégénérés en 5' et une amorce antisens entièrement différente. Quant à la sonde TaqMan®, elle a une séquence et une position différente.

L'utilisation du master mix TaqMan Fast Virus 1-step 1X (Applied Biosystem, CA, USA) permet de réaliser l'amplification dans un délai plus court (~ 70 min, série de 96 échantillons) par rapport au test Biocentric (~ 130 min) et aux tests commerciaux « fermés » Abbott (~ 180 min) et Cobas (~ 120-180 min) (**Tableau 1**), dans les conditions suivantes : RT à 50°C pendant 5 min, inactivation de la RT et dénaturation à 95°C pendant 20 s, et amplification avec 50 cycles à 95°C pendant 3 s et 58°C pendant 30 s (durée totale ~ 70 min).

Dans cette étude, 190 plasmas de VIH-1 M détectés par Biocentric ont été testés avec le nouveau test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor (Etienne et al., 2013). Ils représentaient 8 sous-types de VIH-1 M (A-J), 9 CRFs, dont une majorité de CRF02-AG, ainsi que des URFs. Mis à part 14 (7%) VIH-1 B venant de France, le reste des échantillons provenaient du Burundi, Cameroun, RDC, et du Togo. La sensibilité du nouveau test était de 97,4% (IC 95% : 94,0-99,1), et 3/5 échantillons non détectés avaient des valeurs inférieures au seuil de détection de Biocentric (~300 copies/mL). La spécificité, mesurée à partir de 72 plasmas VIH négatifs provenant du Cameroun, était de 100% (IC 95% : 95,9-100). L'analyse de la concordance a montré qu'il n'y avait pas de différence de mesures entre le nouveau test et Biocentric ($d = 0.02 \log_{10}$ copies/mL, $p = 0,37$), avec une quantification constante des valeurs entre les CV faibles et élevées. 95% des échantillons étaient dans les limites de concordance [$d \pm 1,96$ ET (écart-type)].

De plus, 31 VIH-1 O (9 extraits ADN pour confirmer la détection et 22 plasmas pour confirmer la détection et la quantification par rapport à Abbott) ont aussi été analysés avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor. 10/10 des plasmas déjà détectés avec Abbott l'ont été avec aussi le nouveau test, dont 3 avec une différence supérieure à 0,5 \log_{10} copies/mL en faveur

du nouveau test. Avec celui-ci, 4 nouveaux échantillons ont été quantifiés dans des faibles CV (< 5 000 copies/mL), alors qu'ils n'avaient pas été détectés avec Abbott. Au final, le test a permis de détecter et de quantifier plus de VIH-1 O qu'Abbott avec une sensibilité de 64% vs 45 % (pour 22 échantillons). Enfin, ce nouveau test a amplifié des SIVcpz-*Ptt* et SIVcpz-*Pts* à partir de plasma, mais aussi des SIVcpz et SIVgor à partir de fèces.

Au final, le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor a donc été évalué avec succès pour la détection et la quantification des variants du VIH-1 M (A-J), dont CRF02_AG et d'autres CRFs/URFs, comparé à Biocentric, ainsi que VIH-1 O comparé à Abbott. La limite de détection inférieure est de 300 copies/mL pour une prise d'essai de 200 µL extraite avec le minikit QIAmp viral RNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) et un volume d'élution de 60 µL.

3.3 Plateformes de charge virale simples : « Point of care »

Les plateformes simples (POC, *point of care* en anglais) sont destinées aux laboratoires ayant des infrastructures limitées, situés dans les zones rurales et semi-rurales (décentralisées) de certains pays du Sud. Actuellement, elles n'ont pas encore été mises en place en routine et plusieurs d'entre elles sont toujours en cours de développement (**Figure 28**). Dans cette partie, nous présenterons brièvement les deux plateformes POC de CV déjà évaluées et qui sont en cours de commercialisation : **(1) SAMBA I Semi-Q VL** (DDDU, Cambridge, Angleterre) ; **(2) GeneXpert® HIV-1** (Cepheid).

Dans l'idéal, les plateformes POC devraient répondre aux critères ASSURED (*affordable, sensible, specific, user-friendly, rapide and robust, equipment-free, deliverable*, en anglais), définis par l'OMS (Mabey et al., 2004): **(1) Abordable** (< 500 \$ par appareil et < 10 \$ par test) ; **(2) Sensible** (LDI = 500 copies/mL) ; **(3) Spécifique** ; **(4) Facile à utiliser** (1-2 jours de formation du personnel soignant) ; **(5) Rapide et robuste** (< 90 min par test, bonne capacité de rendement, peu de consommables, durée de vie de l'appareil > 1 an à température ambiante) ; **(6) Sans équipement** (appareil compacte, fonctionnement autonome grâce à des batteries rechargeables, analyses des données sur site) ; **(7) Livrable** (appareil portatif, ordinateur de poche).

De plus, ce type de plateforme devrait utiliser des cartouches de réactifs jetables ne nécessitant pas d'eau. Contrairement aux plateformes de CV complexes, la préparation des échantillons ne devrait pas nécessiter de séparer le plasma du sang total. De plus, leur stockage ou transport éventuels ne devraient pas nécessiter de chaîne de froid. Généralement, les plateformes POC réalisent un seul test de CV à la fois. Leur capacité de rendement est estimée entre 4 à plus de 20 échantillons par jour pour les plateformes ayant plusieurs modules.

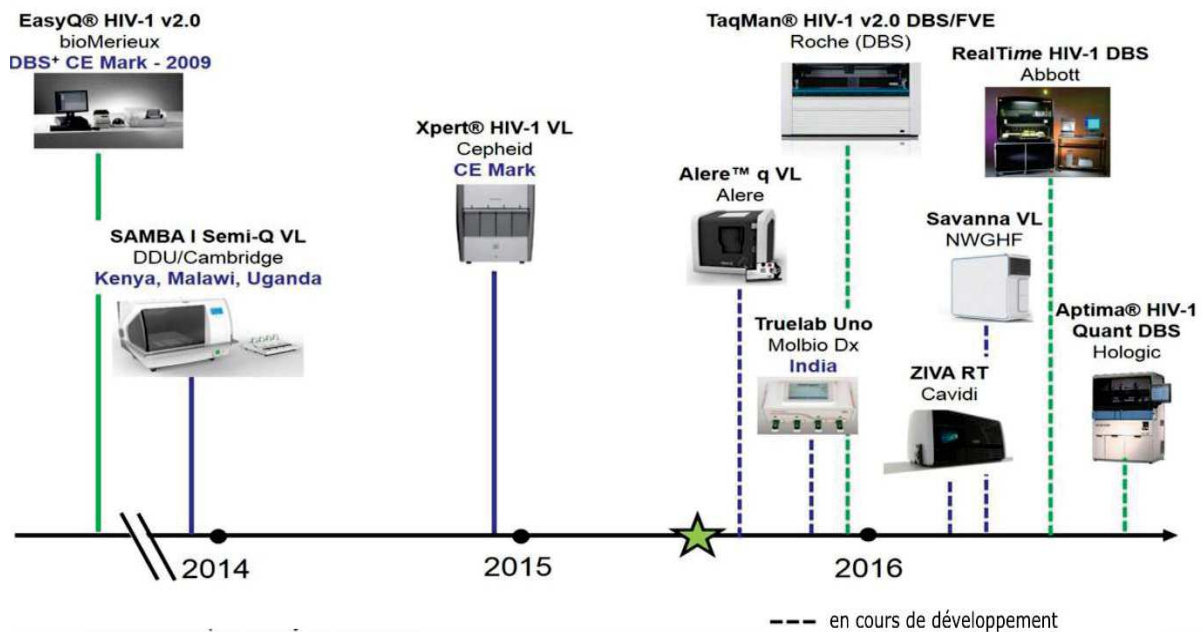


Figure 28. Développement et commercialisation des plateformes simples (POC) et des plateformes complexes adaptées aux DBS.

Les traits **verts** indiquent les plateformes DBS, les plateformes **bleues** indiquent les plateformes DBS (d'après UNITAID, 2015).

Le cadre dans lequel serait réalisé le test POC est autant important que les critères techniques : « *Technology as such does not define a POC test* » (Pai et al., 2015). En effet, le test POC est destiné à être fait au sein même (ou à proximité) de la structure de soin qui réalise le suivi des patients et leur délivre le traitement antirétroviral (TAR). L'objectif est que le test POC et le résultat puissent être réalisés et rendus dans la même journée, afin de pouvoir guider au mieux le clinicien dans la prise en charge thérapeutique de ses patients.

3.3.1 SAMBA Semi-Q VL (DDDU, Cambridge, Angleterre)

La plateforme SAMBA I (*simple amplification-based assay I* en anglais) est une méthode semi-quantitative basée sur un système d'amplification isotherme de la région LTR du VIH-1 et sur un système de détection visuel très sensible sur bandelette (~ 25 min) (Dineva et al., 2005; Lee et al., 2010). Ce système de détection utilise deux sondes d'oligonucléotides, l'une pour la capture des acides nucléiques sur la bandelette et l'autre pour leur détection. La sonde de détection est marquée par de multiples fragments peptidiques sur lesquels vont se lier des anticorps conjugués à des particules colorées, qui vont amplifier le signal en recrutant d'autres sondes de détection. De cette façon, la plateforme SAMBA I permet de détecter visuellement les patients en échec virologique au seuil de 1 000 copies/mL (~ 90 min) (**Figure 29**) (Lee et al., 2010; Ritchie et al., 2014). En vue de son utilisation dans les pays du Sud, SAMBA I a été directement mise au point pour détecter différents variants du VIH-1 M (A-K), dont CRF01_AE et CRF02_AG, ainsi que les groupes divergents N et O (Lee et al., 2010).



Figure 29. Plateforme SAMBA Semi-Q VL.

(a) SAMBA I : système d'extraction SAMBAprep (droite) et système d'amplification et de détection SAMBAamp (cartouche) (gauche) capable de diagnostiquer l'échec virologique au seuil de 1 000 copies/mL. **(b) Interprétation visuelle des résultats de SAMBA I** : (i) CV > 1 000 copies/mL ; (ii) < 1 000 copies/mL ; (iii) invalide. **(c) SAMBA II** : système entièrement automatisé composé d'une unité de contrôle (droite) pouvant gérer jusqu'à huit unités de tests POC (gauche) (d'après Ritchie et al., 2014 et UNITAIDS 2015).

Au cours de son évaluation, le test SAMBA I a montré une bonne concordance des résultats (95-98%) au seuil de 1 000 copies/mL, sur plus de 450 plasmas (200 µL), comparé au test de CV complexe Cobas® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test v2.0 (Roche) (Ritchie et al., 2014). Environ la moitié des échantillons provenaient de patients sous TAR en Ouganda et au Malawi : une centaine de ces échantillons a été directement analysée dans ces pays et le restant en Angleterre. Ainsi, la plateforme semi-automatisée SAMBA I a été évaluée avec succès sur plasma pour le suivi des patients sous TAR dans les pays du Sud, et elle est en train d'être adaptée au prélèvement de sang total (UNITAID, 2015). La plateforme entièrement automatisée SAMBA II est aussi en cours de développement (**Figure 29**).

3.3.2 GeneXpert® HIV-1 VL (Cepheid, CA, USA)

Cepheid est le fournisseur des tests POC de RT-PCR quantitative (GeneXpert HIV-1 VL) pour le suivi virologique et qualitative (GeneXpert HIV-1 qualitative) pour le diagnostic diagnostic précoce du VIH sur DBS ou sang total chez les nouveaux-nés (Ceffa et al., 2016). La plateforme automatisée GeneXpert est constituée d'un seul appareil compact et elle utilise une seule cartouche permettant de réaliser l'extraction, la purification et l'amplification par RT-qPCR (~90 min) (Gueudin et al., 2007; Raja et al., 2005). En plus du VIH, GeneXpert a été développé pour le diagnostic d'autres agents infectieux (MTB, VHB, *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline), oncohématologiques ou autres. Un test est en cours d'évaluation sur le virus Ebola (Semper et al., 2016; Van den Bergh et al., 2016).

Le test GeneXpert HIV-1 VL est capable de détecter les VIH-1 M (A-K) dont CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AB, et les groupes N, O et P ; en ciblant la région LTR du VIH (Gueudin et al., 2016; Jordan et al., 2016). La LDI est de 40 copies/mL pour une prise d'essai d'1mL de plasma. Comparé au test de CV complexe Abbott Real-Time HIV-1 VL, sa sensibilité a récemment été estimée à 95% et sa spécificité à 100%. Au final, il a été évalué avec succès dans les pays du Nord (France, Israël, USA) et récemment transféré au Malawi, où il a toujours montré une bonne concordance des résultats ($\geq 90\%$) comparé au test Abbott Real-Time HIV-1 VL (Ceffa et al., 2016; Gueudin et al., 2016; Jordan et al., 2016; Mor et al., 2015). La quantification du test GeneXpert HIV-1 VL semble comparable au test Abbott, avec une meilleure quantification des VIH-1 C et CRF01_AE.

3.4 Le prélèvement de sang séché sur papier buvard (DBS)

3.4.1 Préparation et stockage des DBS

Le prélèvement de sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais) est relativement facile à réaliser, stocker et transporter (**Figure 30**) (**Annexe A1**). Il suffit de déposer un volume de sang total prélevé par ponction veineuse sur tube EDTA, souvent 50 μL à 70 μL , sur des cercles de papier buvard. En l'absence de personnel formé à ce prélèvement, il est possible d'utiliser une lancette stérile pour faire une pique à l'extrémité d'un doigt du patient, préalablement désinfecté avec de l'alcool (Fajardo et al., 2014; Napierala Mavedzenge et al., 2015; Rutstein et al., 2015; Steinmetzer et al., 2010). Le sang total peut être ensuite recueilli à l'aide d'un tube capillaire EDTA afin de déposer le volume souhaité sur les cercles de papier buvard (Rutstein et al., 2014). Chez les nouveau-nés, la pique se fait au niveau du talon. Ils sont généralement séchés à température ambiante pendant toute une nuit sur une paillasse et dans un laboratoire centralisé équipé, 3h sous la hotte suffisent. Généralement, le papier Whatman Protein-Saver 903 (GE-Healthcare, PA, USA), approuvé par la FDA, est utilisé (Smit et al., 2014). Comme il ne nécessite pas d'étape de séparation pour obtenir le plasma, le DBS est actuellement préféré au DPS (plasma séché sur papier buvard).



Figure 30. Photographie de DBS en cours de séchage au laboratoire de virologie CREMER-IMPM de Yaoundé, au Cameroun.

Contrairement au sang total et au plasma, les contraintes liées à la chaîne du froid et au risque biologique sont réduites sur DBS. Une fois séchés, ils peuvent être conservés deux semaines maximum à + 30°C, avec deux dessiccants (substances hygroscopiques) car ils sont sensibles à l'humidité (Aitken et al., 2015; van Deursen et al., 2010). Dans le cadre de la mesure de la CV VIH, comme l'ARN est sensible à l'humidité et la chaleur, il est toutefois conseillé de stocker les DBS à + 4°C lorsque c'est possible, avant de leur transport vers un laboratoire centralisé (Kane et al., 2008; Monleau et al., 2010). Chaque DBS isolé dans un sachet plastique individuel zippé peut être déposé dans une enveloppe scellée afin d'être acheminé en utilisant les voies de transports disponibles, comme les bus de voyages au Cameroun. Au-delà des deux semaines, les DBS doivent être conservés à -20°C ou -80°C, avec les dessiccants.

3.4.2 Applications : diagnostic précoce, test de résistance et suivi virologique sur DBS

Actuellement, les DBS sont régulièrement utilisés dans les pays du Sud pour faire le diagnostic précoce du VIH chez les nourrissons nés de mère séropositive dans le cadre de programmes de PTME (prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant) (Ciaranello et al., 2011; Gueye et al., 2016; Lofgren et al., 2009; Nkenfou et al., 2012). Contrairement aux adultes, le diagnostic sérologique du VIH ne peut être réalisé chez les enfants < 18 mois car ils sont encore porteurs des anticorps IgG maternels à l'origine de résultats faussement positifs. L'OMS recommande de faire un diagnostic moléculaire dans les 4 à 6 semaines qui suivent la naissance, afin de réduire la mortalité et la morbidité des nouveau-nés en les mettant le plus tôt possible sous TAR (Innes et al., 2014; Violari et al., 2008). En cas d'allaitement, le diagnostic définitif doit également être réalisé à la fin de cette période de risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant (WHO, 2013).

En détectant tous les acides nucléiques (ARN et ADN), la CV qualitative sur DBS représente donc un outil de diagnostic précoce, sensible et adapté aux conditions programmatiques des pays du Sud. Les sensibilité et spécificité de ces tests sur DBS doivent être au minimum de 95% et 98%, comparé au plasma (Gueye et al., 2016). La référence dans ce domaine est le fournisseur Roche, qui proposait initialement la plateforme de diagnostic Amplicor® HIV DNA test v1.5, qu'il a remplacé par le système automatisé Cobas® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test v1.0 puis v2.0 (Gueye et al., 2016; Kébé et al., 2011; Sherman et al., 2005; Stevens et al., 2008). Le test qualitatif d'Abbott (Real-Time HIV-1 assay) est de plus en

plus utilisé (Lofgren et al., 2009). Concernant les plateformes ouvertes et polyvalente, le test Biocentric a été évalué sur DBS et a montré de bonnes performances pour le diagnostic précoce du VIH (Viljoen et al., 2010; Yapo et al., 2013).

Le DBS est un prélèvement fiable et adapté à la surveillance des résistances dans les pays du Sud selon l’OMS, qui a édité un protocole pour la collecte et la prise en charge des DBS (www.who.int/drugresistance/dbs_protocol.pdf) (WHO, 2012 ; OMS, 2014a, 2014b). Les séquences obtenues sur DBS ont une bonne similarité comparée au plasma (78-99%) et l’interprétation finale des résistances est la même dans 90% à plus de 99% des cas (Monleau et al., 2014; Parry et al., 2014). L’amplification par PCR est plus difficile sur DBS dans les faibles CV < 5 000 copies/mL. En outre, il est aussi possible que l’ADN proviral présent dans les DBS soit plus facilement amplifié (Parkin et al., 2012). Lorsque celui-ci ne correspond pas à la séquence ARN de la souche se répliquant chez le patient, cela génère de rares cas de résultats discordants. Dans le cadre de la surveillance des résistances, les tests génotypiques sont de plus en plus réalisés sur DBS chez les adultes sous TAR ayant une CV > 1 000 copies/mL (Boillot et al., 2016; Diouara et al., 2014b), à l’initiation du TAR (Manasa et al., 2016; Mutagoma et al., 2015) et aussi chez les enfants (Salimo et al., 2015; Salou et al., 2016).

Enfin, lorsque le prélèvement de plasma n’est pas réalisable, l’OMS propose d’utiliser le DBS pour réaliser la CV (WHO, 2016a). Actuellement, l’utilisation des DBS pour cette application présente des limites technologiques à connaître afin de pouvoir prendre certaines précautions quant à l’interprétation des résultats (Parkin, 2014).

3.4.3 Limites d’utilisation du DBS pour le suivi virologique

3.4.3.1 Sensibilité inférieure au plasma

La prise d’essai sur DBS varie entre 100 et 150 µL de sang total (2 spots de 50 ou 75 µL), ce qui est inférieur ou égal au volume minimum (140 µL) utilisé pour les tests de CV réalisés à partir de plasma et 7 à 10 fois inférieur à leur volume maximum (1 mL). Comme le DBS est composé de sang total, cette prise d’essai correspond finalement à 55 et 83 µL de plasma, en estimant l’hématocrite à 45%. En outre, la présence de substances interférentes, comme l’hémoglobine, peut inhiber la détection et la quantification sur DBS (Al-Soud et Rådström, 2001).

L'efficacité de l'extraction des acides nucléiques à partir de papier buvard est un facteur important pour la sensibilité de la quantification sur DBS. Par exemple, le kit d'extraction QIAmp viral RNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) n'est pas bien adapté au papier buvard (Monleau et al., 2009). Dans cette étude comparative visant à sélectionner une technique d'extraction efficace, 3/4 des plasmas séchés sur papier buvard (DPS) avec des CV plasmatiques $< 3.5 \log_{10}$ copies/mL n'avaient pas été détectés avec ce kit et une sous-quantification $> 1.4 \log_{10}$ copies/mL avait été observée parmi les autres DPS de CV plasmatique plus élevées. Cette étude a aussi montré que le kit mSample Preparation System (Abbott, IL, USA) sur DBS sous-quantifiait de $0,35 \log_{10}$ copies/mL par rapport au plasma, du fait de l'absorption du plasma sur papier buvard et du protocole d'extraction. Par contre, l'extraction NucliSENS (Biomérieux) avait obtenu des performances comparables entre les deux prélèvements. Enfin, il existe des variations en fonction du papier buvard utilisé. Comparé au papier Whatman 903, les papiers Munktell TFN et Ahlstrom Grade 226 ont montré des résultats un peu divergents, avec une sensibilité inférieure ou comparable pour détecter les échec virologiques au seuil de 1 000 copies/mL (Rottinghaus et al., 2013, 2014).

En partant d'une prise d'essai de sang total égale au plasma, on observe généralement une sous-quantification d'environ $0,50 \log_{10}$ copies/mL sur DBS, avec les tests NucliSENS et Biocentric (Monleau et al., 2014). Pour la faire diminuer, il est possible de corriger la valeur de CV DBS en tenant compte de l'hématocrite calculé pour chaque patient ou estimé par exemple à 50% ($+0,3 \log_{10}$ copies/mL) (Fajardo et al., 2014; Leelawiwat et al., 2009; Viljoen et al., 2010). Le test Abbott a intégré automatiquement un facteur correctif de $+1,96 \log_{10}$ copies/mL dans son logiciel d'analyse et de rendus des résultats de CV DBS (protocole « open-mode »), tenant compte de l'ensemble des facteurs participant à la sous-quantification (hématocrite mais aussi d'autres facteurs tels que l'absorption du plasma et au protocole d'extraction qui n'utilise pas tout le volume lysat) (Marconi et al., 2009). Ainsi, les CV DBS et CV plasmatique sont souvent comparables dans les CV plasmatiques > 3000 copies/mL avec le test Abbott (Erba et al., 2015; Marconi et al., 2009; Rutstein et al., 2014). Toutefois, le seuil de détection sur DBS reste inférieure au plasma et il varie entre 550 et 2000 copies/mL environ, avec respectivement les tests Abbott et Biocentric (Arredondo et al., 2012; Viljoen et al., 2010). La sensibilité sur DBS reste inférieure au plasma, surtout avec les faibles CV plasmatiques $\leq 1\ 000$ copies/mL, où elle varie entre 40-60% contre plus de 95% avec les CV plasmatiques $> 3\ 000$ ou 5000 copies/mL, avec Abbott par exemple (Fajardo et al., 2014; Neogi et al., 2012; Vidya et al., 2012).

3.4.3.2 Impact des acides nucléiques et de l'ADN proviral

Dans le sang total, en plus de l'ARN plasmastique éventuel, on peut trouver les différentes formes des acides nucléiques présents dans les cellules infectées par le VIH : ADNc, ADN non intégré, ADN proviral et ARNm (**Figure 6, partie 1.2.3**). L'ADN proviral est une structure stable qui peut persister très longtemps, même en l'absence de réplication active. En l'absence de suppression virale, il est aussi possible de trouver de l'ARN VIH extracellulaire sous forme attachée aux plaquettes. En fonction de la quantité relative des acides nucléiques totaux présents dans les compartiments (par rapport à la quantité d'ARN plasmastique) et de la technique de CV utilisée (extraction et/ou amplification), les valeurs mesurées sur DBS peuvent être supérieures au plasma. Cela dépend de nombreux facteurs tels que: (1) hémocrite, qui varie en fonction des individus (âge, sexe) et de la clinique (anémie ou polyglobulie) ; (2) prise d'un TAR ; (3) nombre de cellules CD4 et proportion de cellules CD4 infectées ; (4) réplication active des cellules CD4 infectées en cas de prise de TAR ; (5) variabilité inter-individuelle de l'ADN et de l'ARN du VIH (Parkin, 2014).

En cas de TAR efficace, les cellules CD4 sont la principale source d'ARNm et d'ADN VIH cellulaire. Leur proportion normale est égale à 40% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) mais elle diminue lorsque le nombre de CD4 est bas. La quantité d'ADN VIH varie entre 100 et 100 000 copies/10⁶ PBMCs chez les patients naïfs de TAR. Elle décroît jusqu'entre 100 et 2 000 copies/10⁶ PBMCs chez les patients ayant une CV plasmastique indétectable sous TAR (Parkin, 2014). Récemment, la quantité d'ADN impactant sur la mesure de la CV DBS a été estimée à 1 000 copies/10⁶ PBMCs, sur un petit nombre d'échantillons ayant une CV DBS > 1 000 copies/mL alors que la CV plasmastique était indétectable (Zida et al., 2016). Concernant l'ARNm, sa quantité produite est significative lorsque les CD4 infectées sont activées. Dans le cas contraire, on en trouve une petite quantité dans les cellules latentes, allant de 10 à quelques centaines de copies/10⁶ PBMCs.

Une modélisation de l'ensemble des facteurs précédemment cités a montré l'impact des acides nucléiques présents dans les cellules, notamment l'ADN proviral, est le plus important dans les faibles CV plasmatiques ≤ 5 000 copies/mL (**Figure 31**) (Parkin, 2014). Ainsi, les CV DBS peuvent être entre 1,4 et 70 fois supérieure aux CV plasmatiques, respectivement égales à 5 000 et 10 copies/mL. Alors que cela améliore la sensibilité du diagnostic précoce des nouveau-nés, cela peut diminuer la spécificité de la CV sur DBS, comparé au plasma. En fonction des plateformes de CV complexe utilisées (**partie 3.2.2**), un nombre plus ou moins important de résultats faux-positifs sur DBS est ainsi observé.

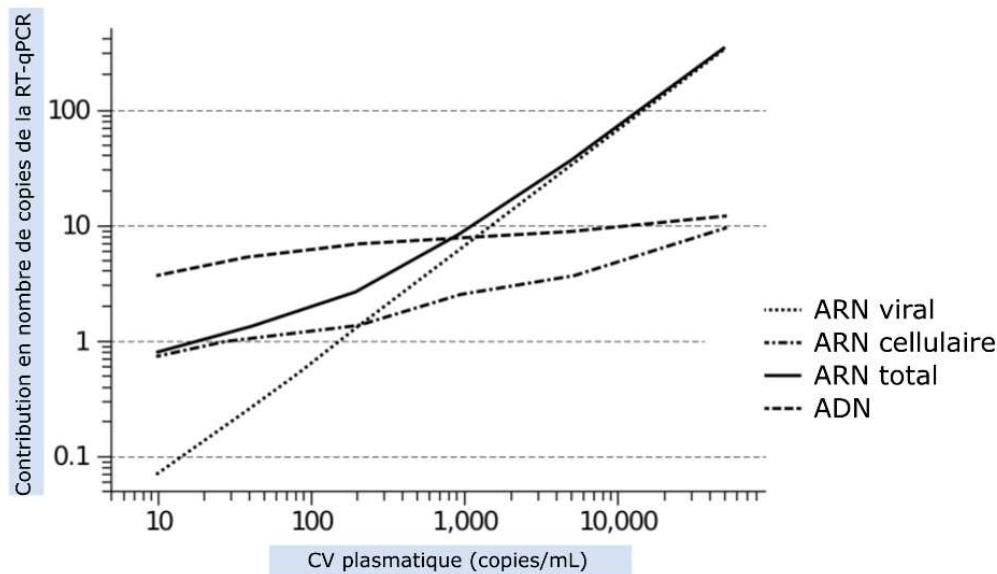


Figure 31. Estimation du nombre de copies initiales d'acides nucléiques totaux présents sur DBS (ARN plasmatique, ARN et ADN cellulaires) en fonction de la CV plasmatique (Parkin, 2014).

3.4.3.3 Comparaison des plateformes de CV au seuil de 1 000 copies/mL

Avec les techniques d'amplification basée sur la RT-qPCR (Abbott, Biocentric, Cobas), tous les acides nucléiques sont amplifiés (**Figure 32**). Dans ce cas, seule une stratégie d'extraction permettant de réduire ou d'éliminer l'ADN des DBS permet d'obtenir une bonne spécificité (Rouet et al., 2014). Par contre, avec la technique NASBA (Nuclisens) qui amplifie seulement l'ARN, une technique extrayant tous les acides nucléiques des DBS peut être utilisée (Mercier-Delarue et al., 2014).

L'évaluation de l'utilisation du DBS a d'abord été réalisée au seuil de 5 000 copies/mL, ce qui correspondait au seuil plasmatique d'échec virologique utilisé à cette période (Lofgren et al., 2009). En 2013, l'OMS a diminué le seuil plasmatique à 1 000 copies/mL et recommandé l'utilisation de la CV sur DBS au seuil de 5 000 copies/mL. Afin d'améliorer la sensibilité du suivi virologique sur DBS, l'OMS vient récemment de proposer d'abaisser aussi le seuil de 1 000 copies/mL sur DBS, si la spécificité de la plateforme de CV utilisée le permet (WHO, 2016a). Dans cette partie, nous présentons brièvement les performances de chaque plateforme, en termes de sensibilité et de spécificité au seuil de 1 000 copies/mL, en comparaison au plasma.

La plateforme Nuclisens, qui utilise la technique NASBA, possède la meilleure spécificité (96-100%), avec toutefois, une sensibilité généralement $\leq 90\%$, qui aurait tendance à diminuer si on augmente le seuil d'échec virologique à 5 000 copies/mL (van Deursen et al., 2010; Fajardo et al., 2014; Mercier-Delarue et al., 2014; Monleau et al., 2014; Napierala Mavedzenge et al., 2015). Pour ces raisons, le seuil d'échec virologique à 1 000 copies/mL semble bien adapté à cette technique qui est moins sensible car elle cible la région gag p24 et elle ne surquantifie pas les valeurs en amplifiant l'ADN des faibles CV.

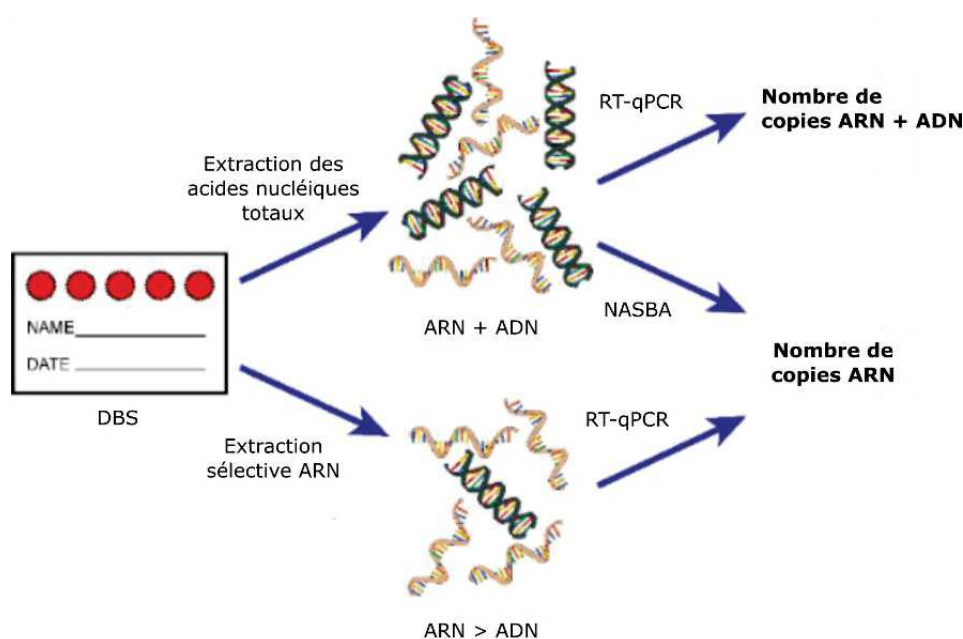


Figure 32. Schéma représentant l'impact des techniques d'extractions et d'amplifications utilisées par les plateformes de CV complexe dans la mesure des acides nucléiques présents sur les DBS (Parkin, 2014).

Concernant les techniques de RT-qPCR, une surquantification dans les faibles CV < 5 000 copies/mL à l'origine de résultats DBS faux-positifs, qui est liée à l'amplification de l'ADN proviral est systématiquement décrite, avec Abbott (Arredondo et al., 2012; Erba et al., 2015; Lofgren et al., 2009; Marconi et al., 2009; Monleau et al., 2009; Rutstein et al., 2014; Vidya et al., 2012), Cobas (Mercier-Delarue et al., 2014; Sawadogo et al., 2014; Waters et al., 2007) et Biocentric (Monleau et al., 2009; Viljoen et al., 2010). Cela entraîne une baisse de la spécificité au seuil de 1 000 copies/mL, alors que la sensibilité est généralement très bonne ($>90\%$) (Mbida et al., 2009; Mercier-Delarue et al., 2014; Monleau et al., 2014; Reigadas et al., 2009; Rutstein et al., 2014; Viljoen et al., 2010).

Actuellement, Abbott représente la seule plateforme à conserver une bonne spécificité (83-100%). Toutefois, beaucoup d'études ont été réalisées chez des patients ayant des CV élevées et il manque des données concernant le suivi virologique des patients sous TAR ayant des faibles CV ou des CV indétectables (Parkin, 2014). Pour Cobas et Biocentric, on estime que la spécificité varie respectivement entre 26-83% et 19-61%. Afin d'améliorer la spécificité, Cobas et Biocentric proposent chacun une stratégie consistant respectivement à éluer les particules virales des DBS dans un tampon de phosphate salin (Wu et al., 2015) ou de traiter les extraits avec de la DNase (Rouet et al., 2014). Toutefois, il manque aussi des données concernant le suivi virologique des patients sous TAR ayant des faibles CV ou des CV indétectable

Chapitre 4. Contexte de la prise en charge et du suivi dans les pays du Sud

4.1 Accès au traitement antirétroviral

4.1.1 La « R » évolution antirétrovirale

Au début de la découverte de l'épidémie VIH/SIDA, la prise en charge thérapeutique des patients consistait à traiter les infections opportunistes, avec un succès très limité. Depuis la mise sur le marché en 1987 de la première molécule ARV efficace, la Zidovudine (AZT), le TAR a connu des évolutions importantes, tant au niveau des stratégies thérapeutiques que de son accès parmi la population infectée par le VIH (**Figure 13, partie 2.1**) (Fischl et al., 1987). Les premiers patients traités vivaient surtout dans les pays du Nord. Ils ont d'abord reçu de l'AZT en monothérapie qui était associée à l'émergence rapide de résistance (Larder et Kemp, 1989; Meyer et al., 1999). Avec la découverte d'autres INTIs, les bithérapies ont ensuite été expérimentées [AZT associée à ddi/ddC (Didanosine/Zalcitabine), puis 3TC (Lamivudine)] (Harrigan, 1995; Jablonowski, 1995; Staszewski, 1995). En 1996, les premiers inhibiteurs de protéase (IP) ont été commercialisés, marquant ainsi l'avènement de la trithérapie [2 INTIs + 1 IP (Indinavir)] qui a aussitôt montré son efficacité à réduire la mortalité et la morbidité des patients vivant dans les pays du Nord (Hammer et al., 1997; Ho et al., 1995; Palella et al., 1998).

Cependant, le coût extrêmement élevé du TAR (10 000-15 000 \$/ patient/ an) et l'absence d'infrastructures médicales et pharmaceutiques adaptées rendaient le TAR inaccessible dans les Pays du Sud (Hogg et al., 1997). Seuls le Brésil et la Thaïlande avaient mis en place des politiques de santé publique pour l'accès aux ARVs. Ainsi, l'espérance de vie de des patients vivant dans les pays du Sud ne dépassait généralement pas quatre ans après l'apparition des signes cliniques liés au SIDA (Kitayaporn et al., 1996; Morgan et al., 1997). Malgré cela, de nombreuses réserves étaient émises quant à la faisabilité et à l'efficacité du TAR dans ces pays. C'est dans ce contexte que les premiers programmes d'accès au TAR ont été lancés : au Chili, Côte d'Ivoire, Ouganda, Vietnam, avec l'appui de l'ONUSIDA (agence des Nations-Unies consacrée au SIDA) nouvellement créée en 1996 ; ainsi qu'au Sénégal avec l'Initiative Sénégalaise d'Accès aux ARVs (ISAARV) en 1998 (Desclaux et al., 2003; Laurent et al., 2002; Weidle et al., 2002). Les résultats de ces différents projets pilotes ont finalement montré que l'observance et le succès immunologique des patients vivant dans les pays du Sud étaient comparables à ce qui était rapporté dans les Pays du Nord. En parallèle, les premiers programmes de prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant (PTME) voyaient le jour.

En 2000, Nelson Mandela a lancé un appel en faveur de l'accès aux TAR au cours de la 13^{ème} conférence internationale sur le SIDA, se déroulant pour la première fois en Afrique subsaharienne (Durban, en Afrique du Sud) : « *le temps d'agir est maintenant, tout de suite* » (Sidley, 2000). Cette date marque le début d'un engagement fort et constant de la société civile, des associations de patients et des Organisation Non Gouvernementales (ONG) en faveur de la baisse des prix des TAR, capables de mobiliser des ressources financières auprès de la communauté internationale. En 2001, la première trithérapie générique (1-2 \$/ patient/ jour) était commercialisée par le laboratoire indien Cipla® et l'OMS inscrivait enfin les ARVs sur sa liste des médicaments essentiels. En 2002, le « Fond Mondial contre le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme » était créé pour apporter des fonds nouveaux, notamment dédiés à l'achat d'ARVs. En 2003, le gouvernement des Etats-Unis lançait aussi son « *plan présidentiel d'aide d'urgence à la lutte contre le sida* » (PEPFAR).

C'est dans ce contexte que l'OMS a émis en 2002 les premières recommandations sur le TAR dans les pays du Sud et proposé une approche globale de santé publique à partir de 2006 (**partie 4.2.1**). Alors que seulement 400 000 patients vivant dans les Pays du Sud étaient sous TAR en 2003, l'objectif « *3 par 5* » de l'OMS a permis de franchir la barre des 3 millions en 2007 (initialement prévue pour 2005)⁴. L'arrivée des combinaisons à doses fixes, telles que Triomune® (d4T/3TC+NVP), a favorisé cet accès au TAR et amélioré l'observance, en permettant de diminuer la posologie de 10-15 comprimés à 1 seul comprimé deux fois par jour (Laurent et al., 2004). En 2006, l'UNITAID a été créée par le Brésil, le Chili, la France, la Norvège et le Royaume-Uni pour améliorer l'accès aux TAR, en particulier les 2^{ème} lignes et les TAR pédiatriques, à partir de fonds récoltés de la taxation des billets d'avions. Au fil du temps, des molécules moins toxiques, plus puissantes et plus robustes face au risque d'émergence de résistance ont été développées. Ainsi, le d4T n'est plus recommandé par l'OMS dans les pays du Sud depuis 2013, au bénéfice de l'AZT. Le Dolutégravir (DTG) vient aussi d'être proposé en TAR de 1^{ère} ligne dans les nouvelles recommandations 2016 de l'OMS.

Plusieurs études, dont l'essai SMART (*Strategies for Management of Antiretroviral Therapy*), ont également montré que l'initiation précoce du TAR avait des effets cliniques bénéfiques (Cohen et al., 2011; Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group et al., 2008). Au fur et à mesure des recommandations, l'OMS a donc augmenté le seuil de lymphocytes T CD4+ (CD4) en dessous duquel les patients étaient éligibles au TAR

⁴ <http://www.who.int/3by5/en/>, consulté de 15/06/16

de 1^{ère} ligne, passant de : ≤ 200 cellules/mm³ en 2002 à ≤ 350 cellules/mm³ en 2010, et ≤ 500 cellules/mm³ en 2013 (Vitoria et al., 2014). De façon mécanique, le nombre de ces patients a régulièrement augmenté. Depuis 2015, tous les patients infectés par le VIH sont éligibles à un TAR, quel que soit leur mesure de CD4 (WHO, 2015 ; 2016)

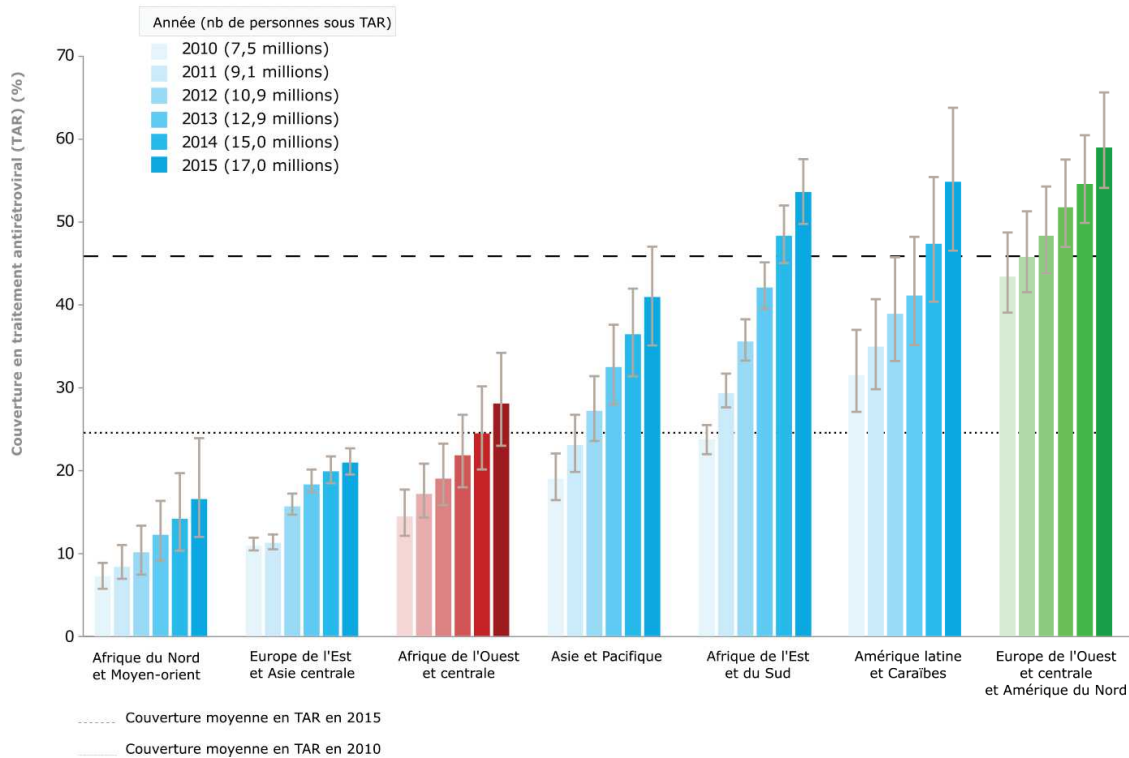


Figure 33. Evolution de la couverture du TAR entre 2010 et 2015, en fonction des régions du monde.

La région d’Afrique de l’Ouest et du Centre est colorée en rouge, le reste des pays du Sud est coloré en bleu, et les pays du Nord sont colorés en vert. Le trait de pointillés serrés représente la couverture moyenne en TAR en 2010 (23%) et le trait de pointillés espacés représente la couverture en TAR en 2015 (46%) (modifié d’après UNAIDS, 2016a, 2016b).

Entre 2010 et 2015, le nombre de patients sous TAR a doublé, passant de 7,5 millions à 17,0 millions, faisant augmenter la couverture en TAR de 23% (21-25%) à 46% (43-50%) (**Figure 33**) (UNAIDS, 2016a ; 2016b). Chez les enfants, la couverture en TAR a augmenté similairement, de 21 % (18-23%) en 2010 à 49% (42-55%) en 2015. En outre, on constate que la couverture en TAR est plus élevée chez les femmes que chez les hommes, avec respectivement 52% (48-57%) et 41% (33-49%) (UNAIDS, 2016b). C’est l’Afrique de l’Est et du Sud, la région du monde la plus touchée par l’épidémie de VIH/SIDA, qui en apportant des adaptations majeures à ses systèmes de santé, a le plus bénéficié de cette augmentation. Sa couverture antirétrovirale est ainsi passée de 24% (22-26%) en 2010 à 54% (50-58%) en 2015,

avec 10,3 millions de personnes sous TAR. Actuellement, la couverture en TAR en Afrique de l'Ouest et centrale reste parmi les plus faibles du monde : environ 3 personnes sur 4 n'ont pas accès au TAR (MSF, 2016). La situation des enfants vivant dans cette région est également alarmante car 90% d'entre-eux n'ont pas accès à un TAR, alors qu'ils représentent 45% des nouveau-nés infectés dans le monde.

4.1.2 Objectifs ONUSIDA en 2030 : « vers la fin de l'épidémie ? »

Actuellement, l'accès ininterrompu à un TAR à vie composé de trois molécules ARV est la seule stratégie qui permette de contrôler efficacement la réplication d'un virus sensible, d'entraîner généralement la restauration du système immunitaire et par conséquent, d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients (**Figure 7, partie 1.2.4**) (Achhra et al., 2016; Hammer et al., 1997; Ho et al., 1995; Palella et al., 1998). Ainsi en Afrique du Sud, l'espérance de vie des patients VIH a été augmentée de 11 ans entre 2003 (arrivée du TAR) et 2011 (Bor et al., 2013). Dans les pays du Nord, l'espérance de vie d'un patient VIH est actuellement proche de la normale, à cinq ans près (Samji et al., 2013). Le TAR permet aussi de réduire de plus de 90% la transmission du virus chez les couples hétérosexuels et homosexuels discordants, et la transmission du virus de la mère à l'enfant (Cohen et al., 2011, 2016; Connor et al., 1994). En Afrique du Sud, une étude a ainsi montré qu'un individu vivant dans une zone rurale où la couverture en TAR est >30%, possède presque 40% de chance de plus de ne pas être infecté par le VIH, comparé à un individu vivant dans une zone où la couverture en TAR est <10% (Tanser et al., 2013).

Depuis les premières recommandations OMS de 2002, l'accès universel au TAR a « *changé la face de l'épidémie* » dans les pays du Sud. Toutefois, il demeure trop lent car actuellement, 54% des patients ne bénéficient pas de TAR. En Afrique Sub-saharienne, les progrès accomplis sont particulièrement menacés par : 1) la résurgence d'une épidémie associée à des virus résistants, 2) la constante dépendance vis-à-vis des financements extérieurs et des importations d'ARVs et de tests de diagnostics, 3) la possibilité d'une crise humanitaire (ONUSIDA, 2015). Cependant, face à ces enjeux majeurs, l'ONUSIDA a récemment défini de nouveaux objectifs ambitieux pour mettre fin à l'épidémie de VIH/SIDA en tant que menace de Santé publique d'ici 2030 (UNAIDS, 2013). La cible « 90-90-90 » a pour objectifs que, d'ici 2020 : 90% des personnes vivant avec le VIH connaissent leur statut sérologique, 90% des

personnes diagnostiquées reçoivent un TAR ininterrompu, et que 90% des personnes traitées aient une suppression virale continue (**Figure 34**).

D'ici 2030, la cible « 95-95-95 » vise le même principe, en continuant d'élargir rapidement l'accès au TAR. De cette façon, l'ONUSIDA estime que 28 millions de nouvelles infections à VIH pourraient être évitées d'ici 2030, ainsi que 21 millions de décès liés au VIH/SIDA (dont presque 6 millions d'enfants). Au-delà de tous ces avantages sanitaires, cette stratégie pourrait aussi engendrer des bénéfices économiques : 3,3 millions de nouvelles infections à VIH évitées d'ici 2050 pourrait faire économiser 30 milliards de dollar à l'Afrique du Sud (Granich et al., 2012). La lutte contre la stigmatisation et la discrimination des adultes, des adolescents et des enfants vivant avec le VIH, et aussi contre la criminalisation de certaines populations à risque, représente un enjeu majeur pour parvenir à ces objectifs.

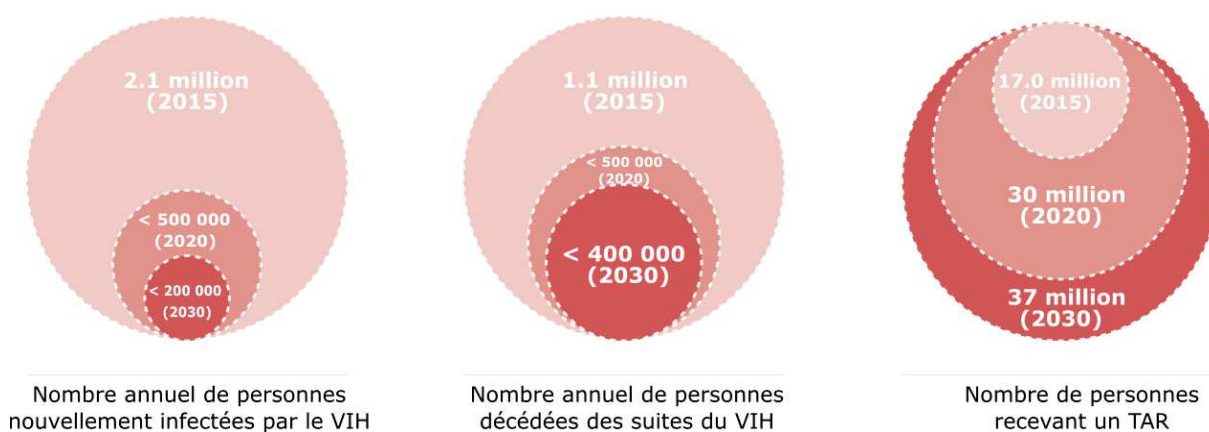


Figure 34. Projection sur les progrès à venir dans la réponse accélérée à l'épidémie de VIH/SIDA à travers le monde, entre 2015 et 2030 (modifié et mis à jour d'après WHO, 2015a).

Lors de la 8^{ème} conférence internationale de la Société Internationale sur la pathogénèse, le traitement et la prévention du SIDA (IAS 2015), en juillet 2015, la communauté de chercheurs et d'experts de la société civile a signé l'appel de Vancouver, demandant que « *Toute personne vivant avec le VIH doit avoir accès à un TAR au moment du diagnostic. Les obstacles liés aux lois, à la politique, à la stigmatisation et aux préjugés doivent être affrontés et démantelés. Dans le cadre d'une prévention combinée, la prophylaxie pré-exposition doit être faite afin de protéger les personnes à risque élevé de contracter le VIH* » (Beyrer et al., 2015). Ces nouveaux objectifs de santé publique concernant la prise en charge des patients vivant avec le VIH figurent dans les dernières recommandations de l'OMS (WHO, 2016a).

4.2 Le traitement de 1^{ère} et 2^{ème} ligne

4.2.1 Recommandations de mise sous traitement

Depuis 2002, l'OMS élabore des stratégies d'utilisation des ARVs qui font l'objet de recommandations et d'orientations (**Figure 13, partie 2.1**). L'objectif est d'améliorer la qualité de vie, la prise en charge et le suivi des personnes vivant avec le VIH, principalement dans les pays du Sud. Depuis 2006, ces recommandations visent une approche de santé publique, avec l'utilisation de schémas thérapeutiques simplifiés et harmonisés. Depuis 2010, elles visent également un élargissement progressif de l'accès au TAR tout en améliorant la qualité des soins (Cohen et al., 2011; Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group et al., 2008). En effet, l'infection à VIH non traitée peut être associée à d'autres maladies que le SIDA (dont des pathologies cardio-vasculaires, rénales et hépatiques, différents cancers, ainsi que des troubles neurocognitifs) (Haregu et al., 2012). Les récentes données issues de la recherche clinique et de l'expérience programmatique, dont l'essai Temprano comparant des patients ivoiriens mis précocement sous TAR à ceux qui suivaient les recommandations 2013 de l'OMS ($CD4 \leq 500$ cellules/mm³), ont ainsi montré que l'initiation précoce d'un TAR réduit la morbidité et améliore la survie des patients (INSIGHT START Study Group et al., 2015; TEMPRANO ANRS 12136 Study Group et al., 2015). L'essai clinique randomisé HTPN 052 a également montré que la mise précoce sous TAR réduit de 93% la transmission du VIH chez les couples sérodiscordants hétérosexuels, et cette tendance a aussi été décrite chez les couples homosexuels (Cohen et al., 2011, 2016).

Très récemment à la fin de l'année 2015, l'OMS est passée du concept « *Test and wait* » (« *Tester et attendre* », en français) à « *Test and treat* » (« *Tester et traiter* », en français), révolutionnant les conditions d'accès au TAR dans les pays du Sud (WHO, 2015). Jusqu'ici, la mise sous TAR concernait principalement les patients ayant une mesure de $CD4 < 500$ cellules/mm³ (WHO, 2013). Les nouvelles recommandations préconisent désormais une mise sous TAR dès le diagnostic, quel que soit le nombre de CD4 et le stade clinique de la maladie (WHO, 2016a). Toutes les catégories de personnes infectées par le VIH sont concernées : adultes (> 19ans), femmes enceintes et allaitante, adolescents (10-19 ans), enfants (1-< 10 ans) et nourrissons (< 1 an). Lorsque l'accès universel au TAR n'est pas disponible, l'OMS recommande d'initier le TAR prioritairement chez les patients ayant $CD4 \leq 350$ cellules/mm³ ou un stade clinique avancé ou sévère de la maladie (stade 3 ou 4), ainsi que les enfants < 2 ans.

4.2.2 Schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS

4.2.2.1 Traitement antirétroviral de 1^{ère} ligne

Lors de la mise sous traitement antirétroviral (TAR) de 1^{ère} ligne, l'OMS recommande d'administrer deux inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI), associés à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) (**Tableau 2**) (WHO, 2016a). Comme en 2013, le schéma thérapeutique privilégié chez les adultes, les femmes enceintes et les adolescents est :

TDF + 3TC (ou FTC) + EFV

en formulation combinée à dose fixe avec un seul comprimé par jour

Si cette association est contre-indiquée ou n'est pas disponible, il est toujours possible de remplacer TDF par AZT et/ou EFV par NVP. Du fait de sa toxicité, le d4T n'est plus recommandé depuis 2013. En nouveau schéma alternatif, l'OMS propose aussi le remplacement d'EFV par **EFV₄₀₀ ou DTG**, dans ces dernières recommandations.

Chez les enfants de moins de 3 ans, l'OMS recommande un TAR de 1^{ère} ligne basé sur un inhibiteur de protéase (IP), en raison à la fois du risque de résistance transmise aux INNTIs au cours de la PTME, mais aussi de la meilleure barrière génétique des IPs. Le schéma thérapeutique recommandé est ABC (ou AZT) + 3TC + LPV/r. Après 3 ans, dans le but de faciliter et harmoniser le schéma thérapeutique vers celui de l'adulte, il est recommandé de remplacer le LPV/r par l'EFV. Dans le cadre de la PTME, un nourrisson né d'une mère infectée par le VIH et qui présente un risque élevé d'acquisition du VIH doit recevoir une prophylaxie par administration d'AZT + NVP pendant les six premières semaines de vie, qu'il soit ou non allaité. En cas d'allaitement au sein maternel, cette durée doit être augmentée de six semaines supplémentaires (ce qui porte la prophylaxie pour le nourrisson à 12 semaines au total). Un nourrisson né d'une mère infectée sous TAR doit aussi recevoir une prophylaxie par administration de NVP, variant de 4 à 6 semaines selon qu'il soit ou non allaité (WHO, 2016a).

Dans les pays du Nord, le TAR est individualisé au regard de la tolérance attendue, de sa commodité de prise en fonction des conditions et du mode de vie des patients, dans le but de favoriser l'adhérence. De plus, le TAR est adapté en fonction des résultats du test génotypique de résistance pré-thérapeutique, des comorbidités, et de son coût (**Morlat 2013**). Ainsi, les TAR de 1^{ère} ligne sont prioritairement basés sur **2 INTIs (TDF/FTC ou ABC/3TC)** qui peuvent être

associés soit à **1 INNTI (RPV ou EFV)**, soit à **1 IP (DRV/r ou ATV/r ou)**, soit à **1 INI (DTG ou RAL, ELV/c)**. Les molécules surlignées en gras sont celles qui ont un niveau de recommandation élevé en France, les autres ayant un niveau intermédiaire. Chez les patients en succès thérapeutique, il est possible de simplifier la prise du TAR, en diminuant notamment le nombre de prises et/ou comprimés, et de plus en plus en envisageant un d'allègement thérapeutique avec certaines bithérapies 1IP/3TC (en cas de succès virologique > 24 mois).

Tableau 2. Schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS dans les pays du Sud en 2016.

POPULATION	SCHEMA DE 1 ^{ÈRE} INTENTION	SCHEMA DE 2 ^{ÈME} INTENTION	SCHEMA DE 3 ^{ÈME} INTENTION
Adultes et adolescents	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1-2 INTI
		2 INTI + DRV/r	
	2 INTI + DTG	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + INTI ± INNTI
		2 INTI + DRV/r	Optimisation du schéma thérapeutique à l'aide du profil génotypique
Femmes enceintes/ allaitant au sein	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1-2 INTI
		2 INTI + DRV/r	
Enfants	2 INTI + LPV/r	Si âgé de moins de 3 ans: 2 INTI + RAL	DTG + 2 INTI
		Si âgé de plus de 3 ans: 2 INTI + EFV ou RAL	DRV/r + 2 INTI
		2 INTI + EFV	DRV/r + DTG ± 1-2 INTI
	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	

4.2.2.2 Traitement antirétroviral de 2^{ème} ligne (voire 3^{ème} ligne)

Dans le cadre d'un TAR de 2^{ème} ligne chez l'adulte et l'adolescent, l'OMS recommande d'introduire un IP (**Tableau 2**), en remplacement de l'INNTI, avec comme schéma thérapeutique privilégié :

2 INTI + ATV/r ou LPV/r

Le DRV/r peut être utilisé en alternative au LPV/r. Concernant les INTIs, si TDF + 3TC a été administré en 1^{ère} ligne, AZT + 3TC doit être administré en 2^{ème} ligne et vice-versa. Enfin, la combinaison RAL + LPV/r est également une nouvelle stratégie alternative proposée chez les enfants.

Les TAR de 3^{ème} ligne sont très peu disponibles dans les pays du Sud et l'OMS recommande leur mise en place. Les schémas recommandés sont basés sur des molécules de 2^{ème} génération, à forte barrière génétique, avec l'introduction des inhibiteurs d'intégrase (INI). Le schéma thérapeutique privilégié par l'OMS est :

DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1-2 INTI.

En cas d'échec thérapeutique lié à l'administration des différentes stratégies alternatives proposées par l'OMS, il est recommandé de faire un test génotypique de résistance pour optimiser le schéma thérapeutique de 3^{ème} ligne. Un patient en échec de TAR de 2^{ème} ligne pour lequel on ne disposerait pas de nouvelles options d'ARVs devrait quand même continuer à recevoir un schéma thérapeutique bien toléré, d'après l'OMS.

4.2.2.3 La PrEP

La prophylaxie pré-exposition (PrEP, *Pre-Exposure Prophylaxis* en anglais) correspond à l'utilisation d'ARVs visant à empêcher aux personnes à risque de contracter le VIH. Elle a récemment été testée dans plusieurs essais cliniques menés sur différentes populations vivant dans plusieurs pays : hommes et femmes hétérosexuels, au Botswana, Kenya et Ouganda (Partenaire PreP et TDF-2) ; HSH en Amérique du Sud, Afrique du Sud, Etats-Unis, et Thaïlande (iPrEX) ; UDI à Bangkok (Etude Ténofovir). Les effets protecteurs variaient entre : 49% et 76% sur toutes les populations des différentes études ; 75% (UDI) et 90% (autres populations) sur les populations ayant une haute adhésion. Deux autres études (FEM-PreP et VOICE) menées chez des femmes hétérosexuelles vivant dans le Sud de l'Afrique n'ont d'ailleurs montré aucun effet protecteur de la PrEP, du fait de leur faible adhésion.

La PrEP vient d'être fortement recommandée par l'OMS chez les populations ayant un risque substantiel d'acquérir une infection à VIH (incidence du VIH > 3% par an). Cette stratégie apporte une option supplémentaire de prévention du VIH à l'utilisation du préservatif (le plus recommandé), la consultation comportementale, la prophylaxie post-exposition, mais également le traitement des IST, la circoncision médicale masculine volontaire et le TAR pour les partenaires de patients infectés par le VIH.

La PrEP est actuellement composée de TDF (300 mg) associé à FTC (200 mg). Elle peut s'administrer « en continu », à raison d'un comprimé par jour, ou « à la demande », à raison d'un schéma nécessitant d'anticiper ses rapports sexuels (2 cp à prendre entre 2h et 24h avant le rapport sexuel/ 1cp à prendre 24h ± 2h après la première prise/ 1cp à prendre 24h ± 2h après la deuxième prise) (IperGay). L'avantage de ce dernier schéma est qu'il permet d'arrêter de prendre des comprimés dans des périodes de moindre activité sexuelle ou de rapports protégés par un préservatif. Pour limiter la sélection de souches résistantes sous PrEP, elle doit être administrée uniquement à des patients non infectés par le VIH, et elle doit être ensuite associée à un suivi continu, incluant notamment le dépistage régulier du VIH.

4.3 Accès au suivi virologique et échec thérapeutique

4.3.1. Place de la charge virale au fil des recommandations de l'OMS

Lors de la mise en place et de l'accès généralisé au TAR de 1ère ligne dans les pays du Sud en 2002, l'OMS a d'abord recommandé de faire un **suivi clinique**, selon les critères suivants : évolution du poids, modification de la fréquence et/ou gravité des symptômes associés au VIH (ex. fièvre, diarrhée), manifestations physiques (ex. candidoses oropharyngées ou vulvovaginales), et signes d'IRIS (syndrome de reconstitution immunitaire) ou de progression des pathologies liées au VIH (WHO, 2002). Dès 2003, le **suivi immunologique**, basé sur la mesure du nombre des CD4, a été conseillé (WHO, 2003). La charge virale (CV) VIH était décrite comme un outil important concernant le suivi biologique des patients mais « *trop complexe et trop cher à mettre en place* » dans les Pays du Sud. L'OMS exprimait alors déjà le souhait que des tests de CV simples et peu coûteux puissent à l'avenir exister.

Dans les lignes directrices de 2006 et 2010, l'OMS a continué de plaider en faveur du suivi immunologique par rapport au suivi clinique, et du suivi virologique par rapport au suivi immunologique (WHO, 2006, 2010). Cependant, le critère clinique restait majoritaire pour décider du changement de TAR, au seul et unique schéma de 2ème ligne dans les pays du Sud qui était disponible (**Tableau 3**). En 2010, l'OMS recommandait la **CV ciblée** (uniquement en cas de suspicion d'échec clinique ou immunologique), à l'instar d'un suivi virologique de routine, du fait du manque de ressources et d'infrastructures de laboratoires adaptées (WHO, 2010). Dans les très rares cas où la CV était disponible, il est intéressant de noter que le seuil d'échec virologique (EV) était de 10 000 copies/mL en 2006 et de 5 000 copies/mL en 2010, alors qu'il est actuellement de 200 copies/mL dans les pays du Nord (Morlat, 2013).

Finalement, c'est en 2013 que l'OMS a émis une recommandation forte à l'égard du suivi virologique avec la **CV de routine** pour tous les patients sous TAR : après 6 mois de TAR, puis tous les 12 mois (WHO, 2013). Ce suivi s'ajoutait à la mesure des CD4 préconisée à l'initiation du TAR, puis tous les 6 mois. Une recommandation forte signifiait que l'OMS était confiante du fait que les effets positifs attendus l'emportaient sur les éventuels effets indésirables liés au TAR. La qualité des données était faible car l'avantage du suivi virologique en termes d'amélioration de la survie ou de la clinique n'avait souvent pas pu être démontré.

En effet, les études menées dans les pays du Sud pour comparer différentes stratégies de suivi (virologique *versus* immunologique et parfois clinique) ont souvent rencontré des limites directement liées à la méthodologie des études (conditions non programmées, durées courtes, données de résistance peu exploitées) (Jourdain et al., 2013; Koethe et al., 2010; Laurent et al., 2011; Mermin et al., 2011; Okoboi et al., 2016).

Tableau 3. Utilisation combinée du statut clinique, du nombre de CD4 et de la CV pour guider le changement de TAR (modifié d'après WHO, 2006).

	Stade 1 (OMS)	Stade 2 (OMS)	Stade 3 (OMS)	Stade 4 (OMS)
Échec en fonction du nombre de CD4 (Test de la charge virale non disponible)	Ne pas changer de schéma thérapeutique. Suivre le patient et surveiller la survenue de signes et de symptômes cliniques. Répéter la numération des CD4 après trois mois.	Ne pas changer de schéma thérapeutique. Suivre le patient et surveiller la survenue d'une éventuelle progression clinique de la maladie. Répéter la numération des CD4 après trois mois.	Envisager de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.	Il est recommandé de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.
Échec en fonction du nombre de CD4 et échec virologique	Envisager de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.	Envisager de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.	Il est recommandé de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.	Il est recommandé de passer* à un schéma thérapeutique de deuxième intention.

*Il ne faut pas passer d'un TAR de 1^{ère} ligne à un TAR de 2^{ème} ligne avant d'avoir donné suffisamment de temps au schéma thérapeutique de 1^{ère} ligne pour réussir, c'est-à-dire au mois 6 mois. On évitera un changement trop précoce car, le plus souvent, on ne dispose que d'un seul TAR de 2^{ème} ligne.

L'objectif de mettre en place l'accès à la CV en routine était de détecter ou confirmer précocement un échec thérapeutique et si besoin, de renforcer l'adhérence (**Figure 34**) (Bonner et al., 2013; Harrigan, 1995). Dans les pays du Sud, le seuil de l'échec virologique est aujourd'hui fixé à 1 000 copies/mL, justifié par l'éventuelle présence de « blips » (virémies transitoires de faible amplitude entre 50 et 1 000 copies/ml), correspondant habituellement à une répllication ponctuelle liée à un épisode de moindre observance ou un épisode infectieux intercurrent, et parfois à la sensibilité de la technique de CV (Morlat, 2015; Young et al., 2015). De plus, les risques de transmission du VIH et de progression de l'infection sont diminués en dessous de 1 000 copies/mL (Loutfy et al., 2013; Quinn et al., 2000).

Dans les pays du Nord, le seuil de l'échec virologique est généralement fixé à 200 copies/mL et un suivi renforcé est mis en place dès la survenue d'une CV > 50 copies/mL. Même si la persistance d'une faible virémie (50 - 1 000 copies/mL) est effectivement associée à un risque d'EV (Laprise et al., 2013), l'OMS n'a pas encore émise de recommandation concernant la prise en charge de ces patients dans les pays du Sud.

4.3.2. Echec thérapeutique dans les pays du Sud

4.3.2.1 Définition de l'OMS en 2016

L'échec thérapeutique correspond à une absence de contrôle de la réplication virale par le TAR. Il peut être dû soit à la concentration sous-optimale d'ARVs, causée par différents facteurs (ex. défaut d'observance, ruptures de stock, posologie inadaptée ou interaction médicamenteuses), soit à la résistance du VIH à un ou plusieurs ARVs.

Dans les pays du Sud, il peut être mis en évidence directement au niveau virologique (rarement, lorsque la CV est disponible) ou indirectement au niveau immunologique, et plus tardivement au niveau clinique (**partie 4.3.3**), selon les définitions suivantes des lignes directrices 2016 de l'OMS :

(1) Echec virologique (EV) : CV plasmatique > 1 000 copies/ml persistante (deux CV à 3 à 6 mois d'intervalle, avec un soutien à l'adhérence au TAR entre les deux mesures) (**Figure 35**). Concernant la CV sur DBS, la valeur seuil vient d'être abaissée de 5 000 à 1 000 copies/mL.

(2) Echec immunologique (EI) : CD4 < 250 cellules/mm³ associé à un échec clinique ou persistance d'un nombre de CD4 < 100 cellules/mm³ (Gilks et al., 2013).

(3) Echec clinique : évènement clinique nouveau ou récurrent indiquant une immunodéficience sévère (stade OMS 4 ou 3 pour certaines maladies comme tuberculose pulmonaire et infections bactériennes sévères).

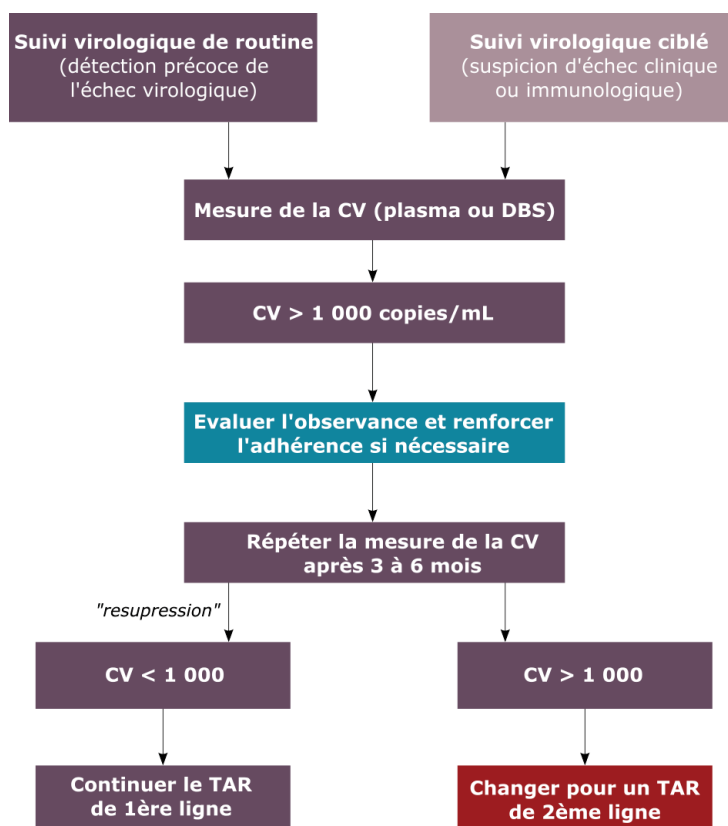


Figure 35. Stratégies de mesures de la CV pour détecter ou confirmer un échec thérapeutique et changer de TAR chez l'adulte, l'enfant et l'adolescent.

En l'absence de suivi virologique de routine, la CV peut être réalisée dans le cadre d'un suivi virologique ciblé (mauve pâle). Si la 1^{ère} mesure de CV est > 1 000 copies/mL (sur plasma ou DBS), il est nécessaire d'évaluer l'observance et de renforcer l'adhérence si nécessaire (bleu). Si la 2^{ème} mesure de CV est > 1 000 copies/mL, il est nécessaire de faire un changement pour un TAR de 2^{ème} ligne (rouge). Ensuite, le principe du suivi virologique est le même pour les patients sous TAR de 2^{ème} ligne (modifié d'après WHO, 2013).

4.3.2.1 Importance de l'observance pour limiter le risque d'échec thérapeutique

Dans cette partie, il est nécessaire de rappeler que l'observance au TAR sur le long terme demeure l'enjeu clé d'une suppression virale durable chez les patients VIH des pays du Sud (Billioux et al., 2015; WHO, 2015). Elle est directement liée aux conditions programmatiques et à la gestion des programmes de TAR. Dans les pays d'Afrique sub-saharienne les ruptures de médicaments sont fréquentes (Fokam et al. 2015). De plus, les longues durées d'attente dans les services de soins et de délivrance du TAR, les coûts directs et indirects du TAR qui restent élevés pour certains patients, sont des obstacles majeurs à l'observance. Dans beaucoup de cas, le manque d'observance est aussi dû au médicament, à cause des effets indésirables et des schémas de prises qui, même s'ils se sont améliorés, peuvent rester contraignants pour le patient.

Enfin, il peut être dû à un manque d'adhérence, en cas d'oubli de comprimé par le patient : déplacement en dehors du domicile, changement d'habitude, survenue d'une dépression ou d'une autre maladie, consommation d'alcool, manque d'intérêt pour la prise du TAR ou mauvaise compréhension des bénéfices du TAR. Un environnement stigmatisant et discriminant constitue également un frein à l'observance. L'observance doit pouvoir s'appliquer dans toutes les zones démographiques, à tous les stades de l'infection, et chez toutes les catégories de patients (adultes, femmes enceintes, enfants et adolescents, populations clés, patients ayant des troubles mentaux).

4.3.2.2 Place du test génotypique de résistance dans les pays du Sud

Le test génotypique de résistance du VIH aux antirétroviraux (ARV) n'est pas recommandé dans les pays du Sud, ni à l'initiation du TAR, ni au moment de l'EV (pour vérifier la présence de mutations de résistance et choisir un TAR adapté), contrairement aux pays du Nord. En effet, il est trop cher et trop complexe pour être utilisé en routine dans le cadre d'une approche de Santé publique (WHO 2016). Toutefois, la question de son utilisation à l'échelle individuelle se pose de plus en plus chez les populations les plus à risques d'avoir accumulé des mutations de résistance, comme les adultes en EV de TAR de 2^{ème} ligne, et aussi les enfants qui représentent une population à risque de développer des résistances (Fitzgerald et al., 2013; Lessells et al., 2013, 2014). Dans certains pays comme l'Afrique du Sud, il est ainsi possible de réaliser un test génotypique de résistance en cas d'EV de TAR de 2^{ème} ligne, voire même de 1^{ère} ligne.

Dans les pays du Sud, l'OMS recommande de faire la surveillance de la résistance à l'échelle nationale (WHO, 2012), selon une stratégie constituée des 5 éléments d'évaluation (**Figure 36**) :

(1) Suivi des indicateurs d'alerte précoce de la résistance (EWI, *early warning indicators en anglais*), qui évalue la mesure dans laquelle les sites fonctionnent de manière optimale pour éviter l'émergence de résistances. Il ne nécessite pas de dépenses onéreuses car il utilise les données des dossiers existants des services de consultations et des pharmacies pour évaluer les facteurs associés à l'émergence des résistances (observance mesurée par le retrait des ARV dans les délais, rétention dans les soins à 12 mois, absence de rupture de stocks à la pharmacie, pratiques de prescription, et suppression virale à 12 mois quand le test de CV est disponible) (Fokam et al., 2015; Jonas et al., 2014; Sigaloff et al., 2012; WHO 2016b).

(2) Surveillance de la résistance transmise (TDR, *transmitted drug resistance en anglais*) dans les populations récemment infectées, qui classe la prévalence des TDR dans la catégorie faible (< 5%), modérée (5-15%) ou élevée (> 15%)

(3) Surveillance de la résistance acquise (ADR, *acquired drug resistance en anglais*) dans les populations sous TAR depuis 12 mois (\pm 3 mois) et \geq 48 mois (OMS, 2014a).

(4) Surveillance de la résistance pré-thérapeutique (PDR, *pre-treatment drug resistance en anglais*) chez les patients initiant un TAR et qui peuvent avoir des résistances soit transmises ou soit acquises lors d'exposition préalables aux ARV (PTME, prophylaxie post-exposition, PrEP ou traitement antérieur) (OMS, 2014b).

(5) Surveillance de la résistance initiale chez les populations pédiatriques < 18 mois.

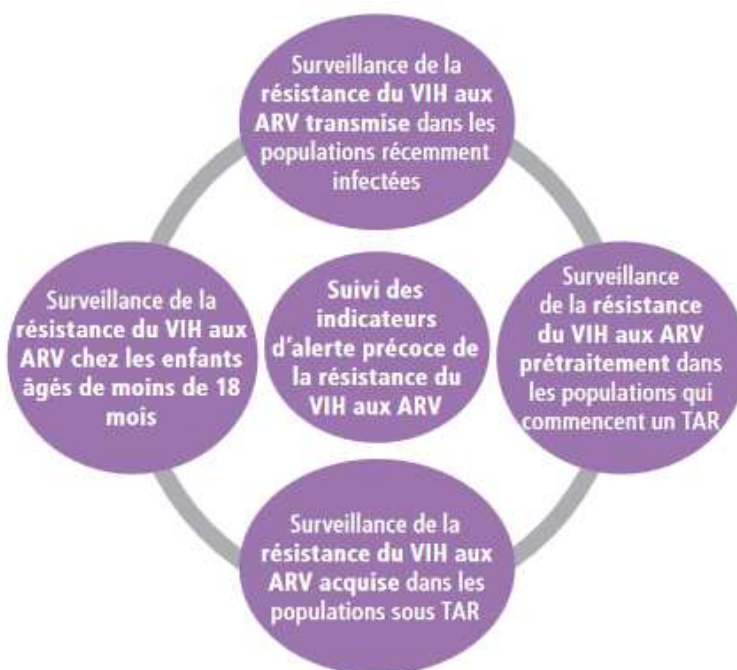


Figure 36. Stratégie pour le suivi et la surveillance de la résistance du VIH aux ARVs (OMS, 2014a).

Cette stratégie vise à éclairer les décisions concernant le choix optimal des différentes lignes de TAR et à identifier les ajustements programmatiques nécessaires pour minimiser l'émergence de la résistance. Elle a été élaborée en collaboration avec l'OMS et le Réseau mondial sur la résistance du VIH aux ARVs (HIVResNet), composé de plus de cinquante institutions internationales, experts et représentants des programmes nationaux de lutte contre

le SIDA. Dans ce cadre, l'OMS a aussi mis en place un mécanisme d'affiliation des laboratoires et un système d'assurance qualité des données de génotypages. Les deux laboratoires où se sont déroulés les travaux de cette thèse, UMI233 TRANSVIHMI de Montpellier (France) et CREMER de Yaoundé (Cameroun), sont agréés par l'OMS (Inzaule et al., 2016a).

4.3.3. Avantages du suivi virologique recommandé par l'OMS comparé aux autres suivis

Dès 2009, des études ont montré que l'échec immunologique (EI) n'est clairement pas un bon prédicteur de l'échec thérapeutique chez les adultes comme chez les enfants (Davies et al., 2011a; Kantor et al., 2009; Keiser et al., 2009; van Oosterhout et al., 2009; Rawizza et al., 2011; Sigaloff et al., 2011a). Quasiment un patient sur deux vivant dans les pays du Sud présentait un EI alors qu'il est en succès virologique, à cause notamment de la mise tardive sous TAR avec des CD4 très bas (≤ 200 copies/mL). Dans ces études, l'EI était défini par une mesure de CD4 inférieure ou égale à celle de l'initiation du TAR, et aussi $CD4 < 100$ cellules/mm³, comme actuellement. Ainsi, ces patients risquaient de changer de TAR (ou « *switch* » d'après l'anglais) inutilement pour une 2^{ème} ligne, souvent plus coûteuse. En pratique, les 2^{ème} lignes de TAR sont aussi rarement disponibles dans les structures de soins décentralisées, ce qui contraint les patients à se rendre dans un centre de référence plus éloigné de leur domicile. A l'inverse, le critère immunologique n'est pas un marqueur précoce de l'échec thérapeutique (**Figure 37**). Ainsi, des patients en EV peuvent rester pendant 6 mois et jusqu'à 2 ans sans EI (Deeks et al., 2004). En cas de suivi immunologique, ils présentent donc le risque d'être « *switchés* » trop tard voire pas du tout, et de développer puis accumuler des mutations de résistance qui réduisent la longévité de leur TAR (Hoffmann et al., 2016; Reynolds et al., 2012; Sigaloff et al., 2011a). Quant au suivi clinique, la survenue d'infections ou de maladies opportunistes étant elles même la conséquence de l'EI, il détecte extrêmement tardivement l'échec thérapeutique et il est associé à une augmentation de la mortalité et de la morbidité (Mermin et al., 2011).

Lorsque la CV est disponible, de récentes études suggèrent que chez les patients en succès virologique, le suivi immunologique apporte finalement peu de données, tout en étant une source potentielle d'anxiété chez des patients présentant des fluctuations cliniques sans importance (Ford et al., 2015b, 2015c; Sax, 2013). En plus de la nouvelle recommandation de

2016 concernant la mise sous TAR quelque soit la mesure de CD4, l’OMS va aussi dans ce sens : elle propose de réduire voire stopper le suivi immunologique, lorsque l’accès à la CV est disponible (WHO, 2016a). Toutefois, la mesure des CD4 reste utile pour apprécier le stade d’évolution de la maladie à l’initiation du TAR, débiter ou stopper la prophylaxie par le co-trimoxazole (seuil de CD4 = 350 cellules/ μ L), et suivre les patients en cas d’échec virologique.

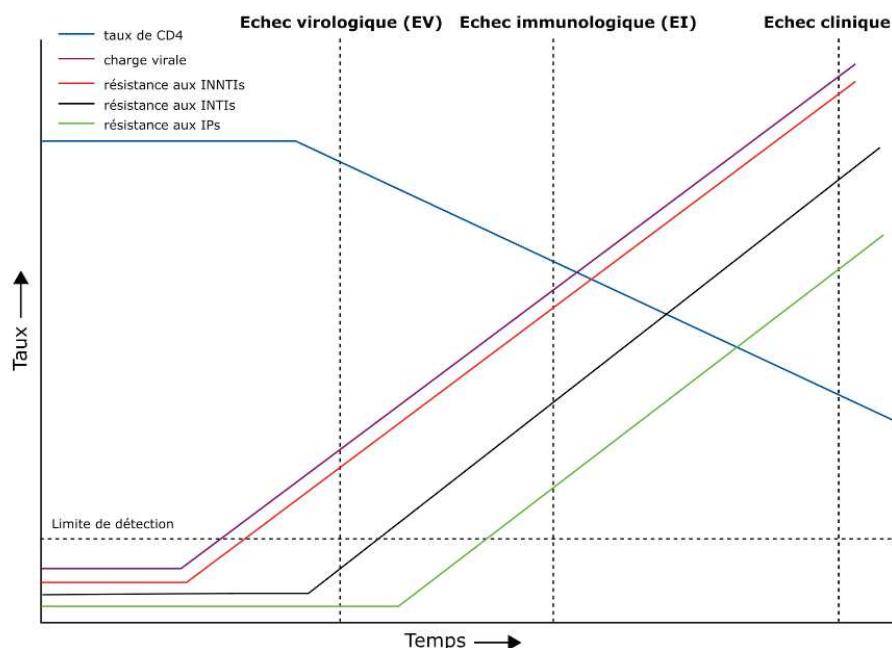


Figure 37. Evolution des différents marqueurs de l’échec thérapeutique et émergence des résistances du VIH aux ARVs au fil du temps (Bartlett et Shao, 2009).

La CV de routine est donc le marqueur le plus précoce de détection et de confirmation d’un échec thérapeutique, associé à une plus grande probabilité de passage en TAR de 2^{ème} ligne (**Figure 38**) (Haas et al., 2015). C’est également un outil d’aide à l’adhérence qui permet la « *re-suppression* » virale chez les adultes rencontrant des difficultés pour suivre la posologie du TAR (Bonner et al., 2013; Gupta et al., 2014). Ainsi, la première CV a un rôle primordial pour détecter rapidement les problèmes liés à l’observance et aussi diagnostiquer précocement un éventuel échec associé à la résistance, en l’absence de test génotypique pré-thérapeutique (Kerschberger et al., 2015). La CV de routine pourrait être coût-efficace dans les pays du Sud avec la diminution du suivi immunologique (Hamers et al., 2012) et la baisse des coûts des tests de CV et du TAR de 2^{ème} ligne (Estill et al., 2013, 2015; Ouattara et al., 2016).

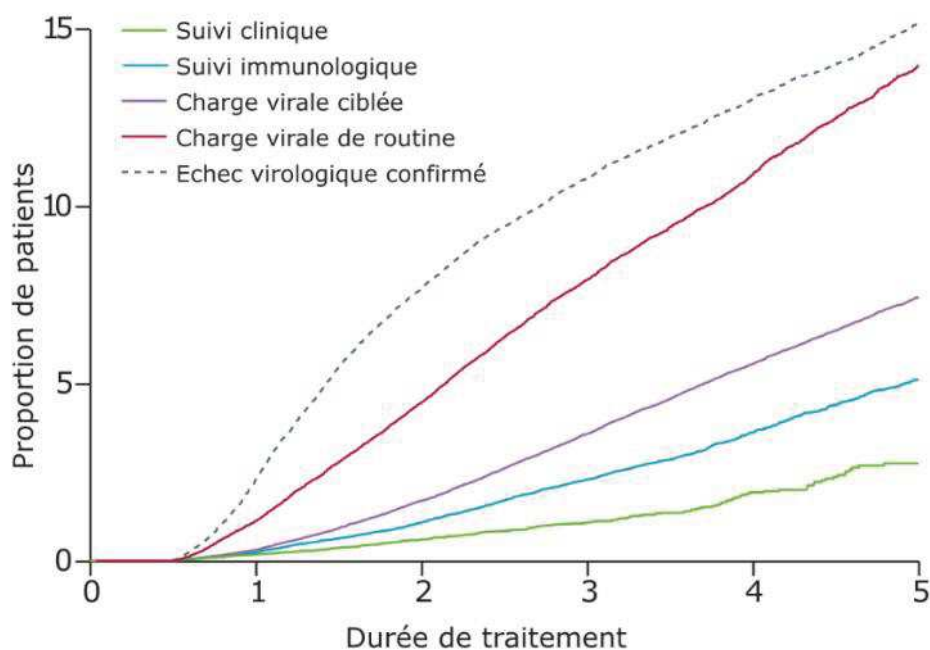


Figure 38. Probabilité de changement de TAR en fonction du type de suivi (modifié d'après Haas et al., 2015).

EN RESUME

La mesure de CV est désormais l'outil de référence de l'OMS concernant le suivi biologique des patients des pays du Sud. Différentes techniques ont été présentées en partie 3 de ce chapitre.

L'accès universel à la CV a deux objectifs principaux :

1) Améliorer la qualité et la durée de vie des patients en augmentant la longévité des TAR, d'abord des molécules de 1ères lignes mais aussi de toutes les autres molécules potentiellement disponibles.

2) Réduire la transmission du VIH à l'échelle individuelle, et aussi des populations

4.3.3. Indisponibilité du test de charge virale dans les pays du Sud

Actuellement, la couverture générale en CV (1 test/an) est estimée à environ 20% seulement des patients sous TAR vivant dans 122 pays du Sud (WHO, 2014b). Elle est extrêmement variable d'un pays à l'autre, en fonction de la disponibilité des tests de CV mais aussi des divergences de recommandations nationales (**Figure 39**).

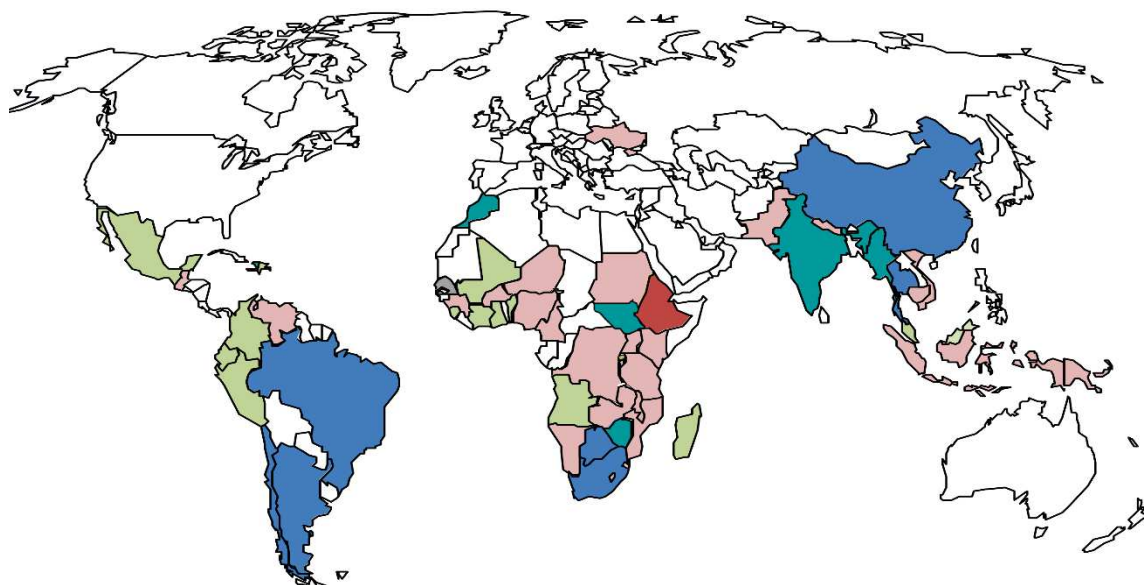


Figure 39. Carte illustrant par pays les lignes directrices et la disponibilité de la CV dans 54 pays du Sud, en 2014.

Dans huit pays, la CV est recommandée seulement en cas de suspicion d'échec thérapeutique : Birmanie, Maroc, Haïti, Inde, Soudan du Sud et Zimbabwe (**vert émeraude**). Elle n'est pas du tout recommandée en Ethiopie (**en rouge**), pour des raisons économiques. Dans 38 pays, elle est recommandée mais pas disponible (**rose**) ou cette donnée n'est pas connue (**vert**). Finalement, la CV en routine est recommandée et disponible dans les sept pays suivants : Afrique du Sud, Argentine, Botswana, Brésil, Chili, Chine et Thaïlande (**bleu**).

Alors que 95% des volumes totaux de tests de CV pour les pays du Sud sont en Afrique Sub-sharienne, seulement deux pays de cette région ont mis en place un accès élargi à la CV leur permettant de satisfaire leurs besoins en tests : Afrique du Sud et le Botswana (**Figure 40**). La majorité des pays du Sud et notamment d'Afrique subsaharienne recommandent donc le suivi virologique de routine en l'absence de test de CV couramment disponible. De plus, l'accès à la CV est différent entre les villes et les zones rurales et semi-rurales (zones décentralisées) d'un pays (Roberts et al., 2016; Vogt et al., 2015).

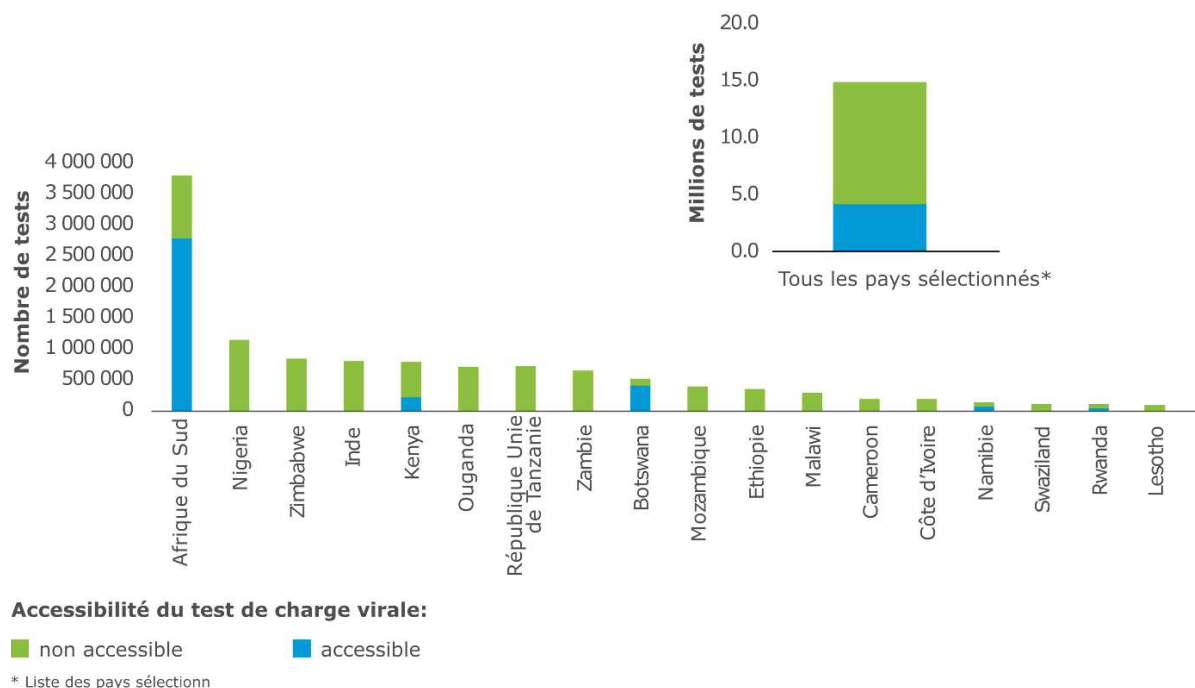


Figure 40. Besoins couverts et non couverts en tests de CV en Afrique subsaharienne, en 2014.

Les besoins sont actuellement couverts en Afrique du Sud et au Botswana. L'Afrique du Sud a initié la CV en 2004 et fait le passage à l'échelle en 2014. Elle réalise désormais plus de 2 500 000 tests par an (soit 75% des volumes mondiaux) (UNAIDS, 2015).

4.3.3.1 Coût des tests de charge virale

Le coût des tests complexes de CV vient de baisser rapidement dans les pays du Sud, suite à l'augmentation des volumes, la compétition entre les fournisseurs et aussi grâce à l'amélioration des négociations. En 2014, l'initiative pour l'accès au diagnostic, lancée à l'occasion de la 20ème conférence internationale sur le SIDA en Australie, avait appelé la communauté internationale à garantir des tests de CV plus abordables pour les pays du Sud. Cet appel a abouti à un accord avec le premier fournisseur mondial de tests de CV (Roche), qui a fixé le nouveau prix de ces réactifs/consommables à 9,40 \$/ test dans 83 pays du Sud, réduisant ainsi son prix moyen de 40 % (UNAIDS, 2015). Ce prix constitue la part la plus importante (50-70%) du coût total d'un test de CV.

Le coût total moyen du test de Roche est finalement d'environ 15 \$ et celui des autres tests varie de 13 à 30 \$, d'après les analyses du Fond Mondial réalisées au début de l'année 2016 (Global fund, 2016). Ce coût inclut les éléments suivants : prix des réactifs, contrôles, calibrateurs et consommables ; prix des équipements (sur 3 ans), de leur installation et des services de maintenance (sur 3 ans) ; coût de la formation du personnel ; et aussi les frais logistiques. Ce coût ne comprend pas les frais suivants : installation et gestion du laboratoire ;

transport, traitement pré-analytique des échantillons et rendu des résultats ; temps de travail du personnel ; évaluation de la qualité ; mise à niveau des équipements ; ainsi que la gestion de leur fin de vie ou leur recyclage. Le prix reste quand même largement supérieur à un test CD4 et demande un équipement sophistiqué et du personnel à former.

La baisse rapide du coût des tests a fait tomber une barrière qui jusqu'ici rendait infranchissable l'accès universel à la CV dans les pays du Sud. Néanmoins, ces coûts restent relativement élevés et continuent d'être une limite, d'autant qu'il existe des disparités importantes entre les pays, tant au niveau du coût du test que des services proposés par les fournisseurs. De plus, l'écart entre les coûts de production des réactifs/consommables et les prix proposés par le fournisseur reste considérable. Le Brésil, le Kenya et l'Afrique du Sud ont les tests les moins chers (coût total d'environ 10 \$ /test) grâce à des volumes élevés et ils montrent qu'une baisse des prix est encore possible pour les autres pays. Pour réaliser la mise à l'échelle du suivi virologique recommandé par l'OMS, les pays vont donc devoir continuer les négociations sur les coûts et les services proposés avec les fournisseurs mais aussi trouver des solutions plus rentables comme les achats groupés de réactifs et de consommables, la location des équipements. La réalisation d'un volume important de tests par jour et de la CV *poolées* chez les patients stables en succès virologique pourrait aussi permettre de réduire les coûts en utilisant les plateformes dans leur capacité maximale (MSF, 2013).

4.3.3.2 Enjeux programmatiques

(1) Infrastructures de laboratoire

Les tests complexes de CV sont réalisés avec des instruments nécessitant des infrastructures sophistiquées telles que : courant continu, air conditionné, eau de qualité de biologie moléculaire, centrifugeuses, réfrigérateurs à +4°C et des congélateurs -20°C, au minimum. Les plateformes de CV complexe nécessitent aussi d'avoir plusieurs salles de manipulations afin d'éviter les contaminations, en respectant un circuit de travail dans l'ordre suivant des salles : (1) réception des échantillons ± extraction, (2) préparation des réactifs d'amplification (ou une hotte dédiée au minimum), (3) amplification et détection des virus (UNITAID, 2015).

Au-delà des moyens physiques, les moyens humains sont extrêmement importants. Les tests de CV nécessitent que différents personnels soient formés en fonction des différents niveaux de compétences suivants : techniques de biologie moléculaire et assurance qualité pour

les personnels de laboratoire, validation et interprétation des résultats pour les biologistes et cliniciens, et aussi installation et maintenance des équipements pour du personnel technique. En effet, les instruments de CV nécessitent une maintenance dont les coûts sont souvent relativement importants, surtout lorsque ce service n'est pas disponible localement. Enfin, le circuit d'approvisionnement en réactifs se fait généralement souvent à -20°C, ce qui nécessite aussi d'avoir les infrastructures de transport adaptées. Le circuit de rendu des résultats nécessite aussi d'avoir un système de gestion des données performant. L'ensemble de ses infrastructures n'est pas du tout disponible partout et constitue un frein à l'accès à la charge virale.

Dans les pays du Sud, le système de laboratoire est pyramidal (**Figure 41**). Les grandes villes possèdent souvent un laboratoire central ou national de référence équipé de plateformes de CV complexe. Les zones décentralisées n'ont pas les infrastructures de laboratoire permettant d'accueillir ces instruments complexes et d'ailleurs, elles ne possèdent parfois même pas de cytomètre de flux fonctionnel pour la mesure des CD4 (Roberts et al., 2016; Vogt et al., 2015).

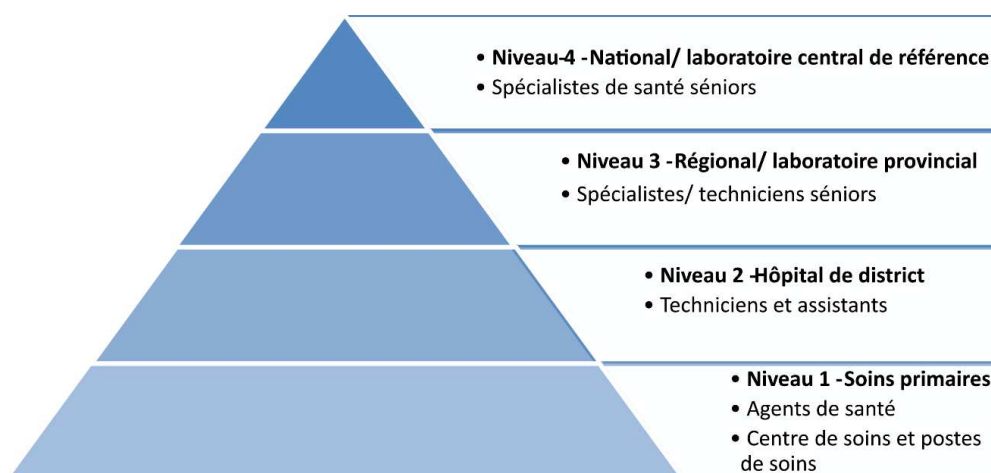


Figure 41. Organisation de la pyramide de soins dans les pays du Sud.

Organisation de la pyramide de soins dans les pays du Sud. Actuellement les tests de CV sont principalement réalisés dans un laboratoire national ou central de référence (niveau 4), situé en ville et pouvant disposer des infrastructures nécessaires. Par niveau décroissant d'infrastructures, il y a ensuite le laboratoire régional/provincial (niveau 3), de district (niveau 2) et le poste de premiers soins (niveau 1).

L'OMS a montré que le nombre de plateformes de CV semblerait suffisant dans les pays du Sud, en termes de couverture actuelle de CV (WHO, 2014b). La question actuelle n'est donc plus de continuer à commander des équipements mais plutôt de savoir « *whether new machines are needed and where ?* ». Alors qu'une plateforme de CV peut, de façon classique, réaliser 100 tests/jour ou 25 000 tests par an, la plupart d'entre-elles sont utilisées de façon sous-optimale dans les pays du Sud. On estime qu'une plateforme de CV est disponible pour une médiane de

2 753 patients sous traitement, avec un écart considérable d'environ 50 à plus de 85 000 patients dans 77 pays (WHO, 2014b). De plus, de nombreux équipements sont inutilisés car ils ne fonctionnent pas ou n'ont pas été installés. Le manque d'utilisation est lié à plusieurs facteurs comme l'absence de personnel formé, infrastructures et locaux inadaptés mais aussi le manque d'approvisionnement continu en réactifs pour réaliser les tests de CV.

(2) Transport des échantillons

Dans les pays du Sud, il n'existe pas de circuit de froid pour le transport des plasmas. En zone péri-urbaine et rurale, l'utilisation de prélèvements alternatifs, comme le DBS (sang total spotted sur papier buvard), est indispensable pour permettre la mise à l'échelle des tests de CV. Ce prélèvement relativement stable peut effectivement être recueilli dans un laboratoire régional ou de district et ensuite envoyé au laboratoire de référence, en vue de réaliser le test de CV. Pour respecter les délais nécessaires à la bonne prise en charge des patients, la mise en place d'un circuit de rendu des résultats performant doit être associée à celle des DBS. (Working Group on Modelling of Antiretroviral Therapy Monitoring Strategies in Sub-Saharan Africa et al., 2015).

4.4 Epidémiologie de l'échec virologique et dynamique de la résistance

4.4.1. Echec virologique et changement de TAR dans les pays du Sud

L'échec virologique (EV) ($CV > 1\ 000$ copies/mL) est inférieur à 20 % chez les patients traités depuis 5 ans, d'après une récente méta-analyse et revue menée dans 35 pays du Sud, dont 2/3 des études de cohortes provenaient d'Afrique sub-saharienne (Boender et al., 2015a). Cependant, cette proportion double lorsqu'on tient compte des décès lié au SIDA et des perdus de vue après 4 ans de TAR. D'autre part, l'EV est hétérogène car il est plus élevé en Afrique sub-saharienne qu'en Asie. Des variations importantes ont aussi été observées à travers l'Afrique de l'Ouest et du Centre, mettant en exergue l'importance d'une stabilité sociopolitique mais aussi une bonne gouvernance des programmes de TAR (**Tableau 4**) (Aghokeng et al., 2014; Mann et al., 2013; Nsanzimana et al., 2015).

Tableau 4. Echecs virologiques (CV > 1 000 copies/mL) et résistance dans les zones urbaines des pays d'Afrique de l'Ouest et du Centre, après 12 et 24 mois de TAR.Les prévalences > 10% sont surlignées en **gras** et celles > 20% sont surlignées en **rouge**. * 6-12 mois

Pays	Date	EV	EV	Résistance	Résistance
		M12	M24	M12	M24
Burkina-Faso	2009-2012 ^a	6	4	4	2
Cameroun	2007 ^b	16	25	4	17
	2009-2011 ^c	9	–	5	–
	2009-2012 ^a	9	14	6	11
Côte d'Ivoire	2006-2009 ^d	25	27	12	19
	2009-2012 ^a	21	14	11	10
Guinée-Bissau	ND ^{e*}	46	11	–	–
Nigeria	2008-2009 ^f	10		5	
RCA	– ^g	–	29	–	22
RDC	2008 ^h		15		12
Senégal	2009-2012 ^a	9	11	7	9
Togo	2008 ⁱ	31		25	
	2009-2012 ^a	18	26	14	25

Références : ^a(Aghokeng et al., 2014), ^b(Kouanfack et al., 2009), ^c(Billong et al., 2013), ^d(Messou et al., 2013), ^e(Jespersen et al., 2015), ^f(Ugbena et al., 2012), ^g(Péré et al., 2012), ^h(Muwonga et al., 2011), ⁱ(Dagnra et al., 2011).

Les estimations globales sont donc à prendre avec précaution, d'autant plus qu'elles sont probablement sous-estimées par le fait qu'elles proviennent généralement de population ayant accès à la CV, alors que c'est rarement le cas, notamment en Afrique sub-saharienne (Boender et al., 2015a). Dans cette région, les précédentes revues avaient trouvé un taux d'EV plus élevé, supérieur à 30% après 2 ans de TAR (Barth et al., 2010; Hammond et Harry, 2008). Récemment, une étude menée au Togo a montré un taux d'EV alarmant de plus de 40% après une longue durée de TAR > 4 ans (Konou et al., 2015a). En zone décentralisée, les données sont rares : l'EV en zone semi-rurale semble comparable au ville (Diouara et al., 2014a; Konou et al.,

2015b), mais de façon inquiétante, celui des zones rurales pourrait être beaucoup plus élevé. Ainsi, au Cameroun et au Gabon, environ 60% des patients vivant en zone rurale avaient une CV > 1 000 copies/mL après seulement 2 ans de TAR (Liégeois et al., 2012; Taieb et al., 2014). Généralement, les facteurs de risques associés à l'EV sont : CD4 < 200 cellules/ μ L à l'initiation du TAR, faible observance, longue durée de TAR, jeune âge (< 30 ans) ; et le genre masculin est aussi souvent décrit (Boullé et al., 2015; Penot et al., 2014).

Enfin, le taux d'EV n'augmentait pas au cours du temps (Boender et al., 2015a), contrairement à ce qui est habituellement observé (Hosseini pour et al., 2013; Jiamsakul et al., 2014; Sigaloff et al., 2011a; Stadelin et Richman, 2012). Ainsi, cette étude soulève un triple problème largement rencontré au cours de la prise en charge des patients dans les pays du sud : (1) l'abandon des soins ; (2) l'absence de détection précoce de l'échec virologique chez la plupart patients poursuivant les soins, et parfois même (3) l'absence de changement pour une 2^{ème} ligne de TAR chez les patients en échec virologique ayant eu accès au test de CV (Boender et al., 2015a; Haas et al., 2015). Le changement de TAR est rare et tardif dans les pays du Sud, d'après les estimations suivantes: < 2% au cours des deux premières années, 5% à trois ans, et 9% à quatre ans (Boender et al., 2015a; Konou et al., 2015a). Tous types de suivis confondus, le taux de changement de TAR, estimé à 1.6 pour 100 patients/an, d'après une récente analyse collaborative menée à partir d'études de cohortes de 16 pays d'Afrique sub-saharienne (Haas et al., 2015). Il est trois fois plus élevé en cas de suivi virologique, et plus fréquent en ville qu'en milieu rural. Cependant, même lorsque celui-ci est réalisé, plus de 40% des patients ayant un échec virologique confirmé de 1^{ère} ligne de TAR ne sont pas « *switchés* » en 2^{ème} ligne de TAR. Dans ce contexte, les CD4 sont bas (\leq 200 cellules/mm³) au moment du changement de TAR, quelque soit le type de suivi.

Le terme de « *silent epidemic* » est utilisé pour caractériser la situation concernant l'EV chez les enfants et les adolescents (Bernheimer et al., 2015). Comme dans les pays du Nord, ils sont entre deux et trois fois plus à risque d'EV que les adultes, et le renforcement de l'adhérence est moins associé à une « *re-suppression* » virale (Frange et al., 2014; Jobanputra et al., 2014). L'EV (CV > 1 000 copies/mL) a précédemment été estimé à 30% après seulement 1 an de TAR, dans une méta-analyse réalisée dans 15 pays du Sud (Ciaranello et al., 2011). Les données plus récentes rapportent une prévalence variable en fonction des pays : EV < 20% en Afrique du Sud et au Cambodge (Barennes et al., 2016; Davies et al., 2011b) ; EV > 50% au Togo et au Sénégal (Kebe et al., 2012; Salou et al., 2016). Malheureusement, les changements de TAR sont aussi rares dans cette population, malgré la description de plus en plus de résistances

(Bernheimer et al., 2015; Desmonde et al., 2015; Sigaloff et al., 2011b; TREAT Asia Pediatric HIV Observational Database (TApHOD) and International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS (IeDEA) Southern Africa Paediatric Group, 2011).

4.4.2. Dynamique de la résistance : comparaison Nord/Sud

De façon générale, l'émergence de virus résistants chez les patients en échec virologique est actuellement une préoccupation importante dans les pays du Sud (Hamers et al., 2013; Vella, 2015). Pour bien le comprendre, nous présentons ici brièvement la situation dans les pays du Nord et du Sud.

4.4.2.1 Résistance transmise du VIH aux ARVs

➤ **Dans les pays du Nord**

Concernant la résistance transmise (TDR) en Europe et en Amérique du Nord, entre 9,4% et 11,5% des patients n'ayant jamais reçu de TAR, présentent une résistance à au moins un ARV, d'après une récente méta-analyse réalisée à partir de 287 études publiées entre 2000 et 2013, et comprenant plus de 50 000 patients naïfs de TAR vivant dans plus de 100 pays différents à travers le monde (Rhee et al., 2015a). Dans les pays du Nord, les TDRs sont d'abord associées aux INTIs, puis aux INNTIs.

En Amérique du Nord, la prévalence des TDRs a tendance à augmenter, du fait de l'augmentation des mutations associées aux INNTIs (**Figure 42**). En Europe, une diminution marginale de la prévalence des TDRs a été observée. Elle serait due à une baisse des TDRs associées aux INTIs, en partie liée aux niveaux élevés de prévalence observés avant 2000, ainsi qu'à l'augmentation des patients venant des pays du Sud où la prévalence des TDRs est moindre. Après un ajustement, cette tendance à la baisse disparaît et finalement la prévalence des TDRs semble stable en Europe, et tout comme en Amérique du Nord les TDRs associées aux INNTIs ont aussi tendance à augmenter (Hofstra et al., 2016; Rhee et al., 2015a). En remarque, les pays à ressources élevées d'Asie, comme le Japon, sont les seuls pays où l'augmentation des TDRs semble liée à l'augmentation des TDRs associées aux IPs. Enfin, la prévalence des TDRs dans les pays du Nord est plus élevée dans les populations HSH (11-13%) que chez les UDI (5-8%) et les hétérosexuels (7-9%) (Frange et al., 2015; Frentz et al., 2014; Pham et al., 2014).

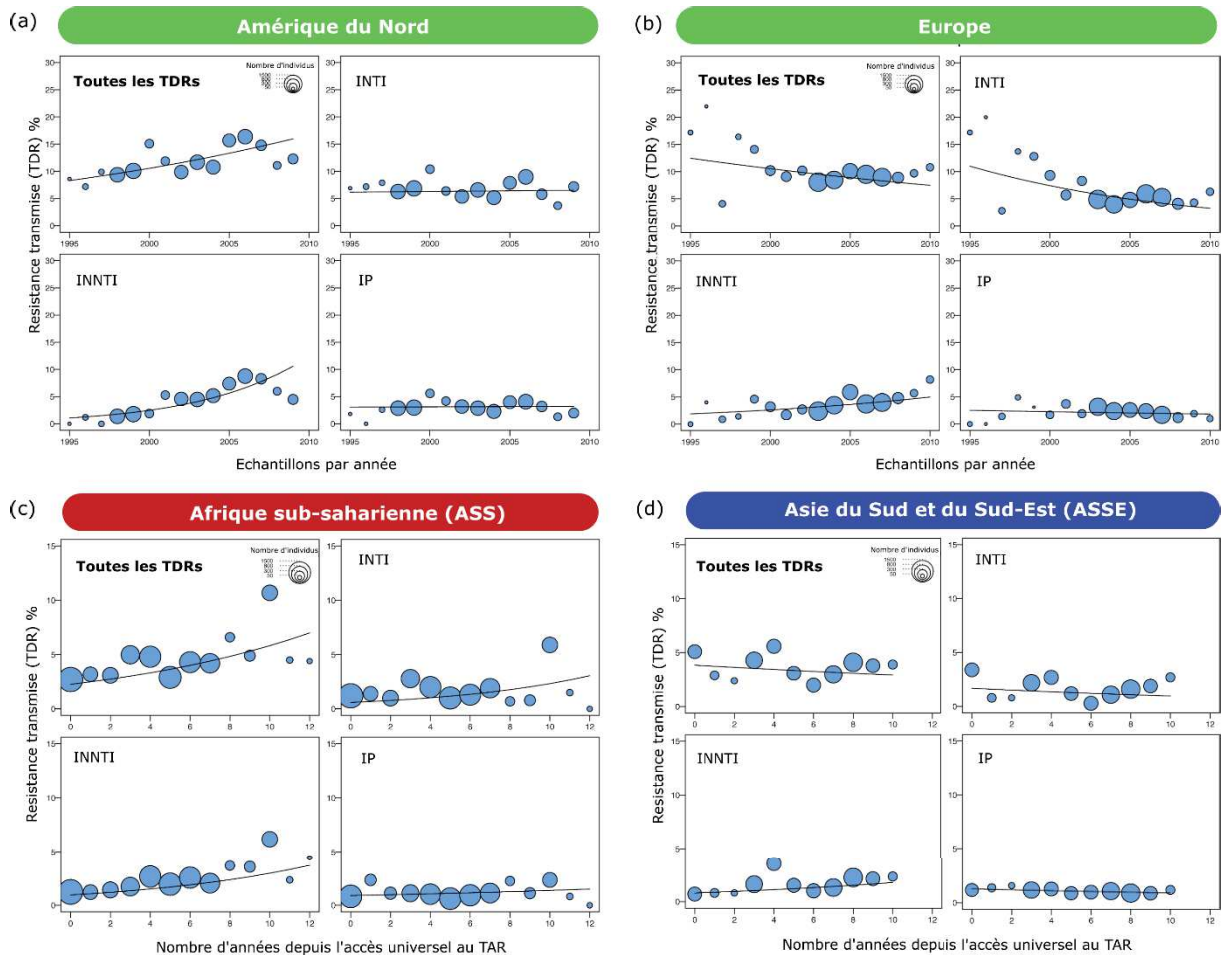


Figure 42. Evolution de la résistance transmise dans les pays du Nord et du Sud.

(a) Amérique du Nord, (b) Europe, (c) Afrique sub-saharienne (ASS), et (d) Asie du Sud et du Sud-Est (ASSE). Les pays du Nord sont surlignés en vert, les pays du Sud sont surlignés en bleu, et parmi-eux l'Afrique sub-saharienne où l'épidémie de VIH/SIDA est la plus importante, est surlignée en rouge (modifié d'après (Rhee et al., 2015a).

Initialement, les TDRs sont transmises par des patients en échec virologique de TAR qui accumulent des mutations de résistance du VIH aux ARVs. Dans les pays du Nord, l'introduction de nouvelles classes d'ARVs a temporairement réduit la prévalence des TDRs, et désormais la transmission semble principalement conduite par les patients naïfs de TAR, qui ont été infectés par un virus déjà résistant (Yang et al., 2015b). Ainsi, une récente étude phylogénétique menée en Angleterre a estimé que 70% des TDRs avaient comme source un patient naïf de TAR (Mourad et al., 2015).

➤ **Dans les pays du Sud**

Aujourd'hui, la prévalence des TDRs est moins élevée dans les pays du Sud, comparé aux pays du Nord (**Figure 42**) (Rhee et al., 2015a; OMS, 2012). La prévalence la plus élevée est observée en Amérique latine et Caraïbes (7,6%), avec une tendance à l'augmentation. Elle varie autour de 3% en Afrique sub-saharienne (ASS) et en Asie du Sud et du Sud-Est (ASSE), ce qui reste encore faible (<5%) d'après la classification de l'OMS. Alors qu'elle semble stable en ASSE, la prévalence des TDRs augmente rapidement avec l'élargissement de l'accès au TAR en ASS (Gupta et al., 2012; Hamers et al., 2013; Rhee et al., 2015a; Stadelin et Richman, 2012).

Avant l'accès universel au TAR en ASS, on estime que la prévalence des TDRs était d'environ 2% (Rhee et al., 2015a). Quatre ans après l'accès universel, on estime que la prévalence des TDRs est supérieure à 3%, et elle atteint environ 5% dans plusieurs études. Ainsi, l'OMS a observé de façon répétée le passage d'un niveau de résistance faible à intermédiaire dans les régions d'ASS au Malawi, en Ouganda, ainsi qu'en Afrique du Sud (OMS, 2012). Dans un contexte de suivi virologique limité, l'augmentation rapide des TDRs pourrait avoir un impact négatif significatif sur l'efficacité des TAR de 1^{ère} ligne et par conséquent augmenter la mortalité (Cambiano et al., 2013). En effet, en l'absence de test génotypique pré-thérapeutique et surtout d'un suivi virologique de routine, ces patients risquent de recevoir un TAR de 1^{ère} ligne sous-optimal et d'accumuler rapidement des résistances.

Dans les pays du Sud, les TDRs sont d'abord associées aux INNTIs, contrairement aux pays du Nord, avec les quatre mutations principales : K101EP, K103NS, Y181CIV et G190A. Elles sont ensuite associées aux INTI, avec les mutations M184VI, TAMs (M41L, D67GN, K70R, L210W, T215YF et K219EQ), les mutations réversibles de T215 (T215CDES) (**Figure 43**).

Récemment, la résistance pré-traitement (PDR), mesurée de façon rétrospective, a été estimée à 5,5% parmi une large cohorte de plus de 2 500 patients vivant dans six pays d'Afrique sub-saharienne (Boender et al., 2015b). Après 3 années de suivi, cette résistance n'était pas associée à une augmentation de la morbidité ou de la mortalité, mais à une augmentation de changement pour un TAR de 2^{ème} ligne.

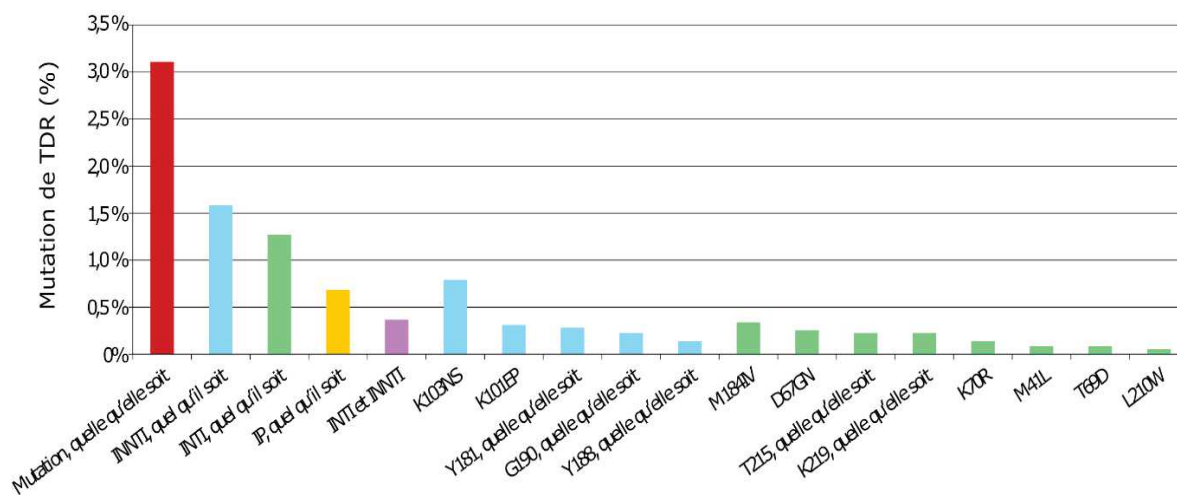


Figure 43. Prévalence des mutations de résistance transmises (TDR).

Enquêtes OMS, 2004-2010 (n=3 588). Le pourcentage de TDR est indiqué en rouge. Les INNTIs, INTIs et IPs sont respectivement indiqués en bleu, vert et jaune. L'association de résistance transmise aux INNTI et INTI est indiquée en violet (modifié d'après OMS, 2012).

4.4.2.2 Résistance acquise du VIH aux ARVs

➤ **Dans les pays du Nord**

Concernant la résistance acquise (ADR), la résistance aux INTIs est aussi la forme la plus fréquente de résistance aux ARVs chez les personnes en échec thérapeutique, suivie par la résistance aux INNTIs et aux IPs. En Europe, plusieurs études ont montré que la prévalence des patients sous TAR ayant au moins une mutation de résistance avait atteint les niveaux les plus élevés (57-80%) à la fin des années 1990 (De Luca et al., 2013; Scherrer et al., 2016). Depuis 10 ans, elle a largement diminué (37%-71%) grâce à l'utilisation de molécules avec des barrières génétiques plus élevées et un suivi virologique rapproché. En Suisse, la proportion de patients multi-résistants aux trois molécules de leur TAR est passée de 9% en 1999 à environ 4% en 2013, et elle est inférieure à 0,4% chez les patients ayant initié un TAR après 2006 (Scherrer et al., 2016). Actuellement, la proportion d'ADR varie respectivement entre 48% en Europe de l'Ouest et 71% en Amérique du Nord, principalement du fait des résistances liées aux INNTIs, généralement remplacés par d'autres molécules (2016).

➤ **Dans les pays du Sud**

Contrairement aux pays du Nord, la résistance acquise sous TAR (ADR) semble augmenter dans les pays du Sud. Les dernières données de l'OMS (2007-2010) ont montré que 72% des patients en échec virologique sous TAR de 1^{ère} ligne avaient au moins une mutation

de résistance, après seulement 12 mois de TAR (OMS, 2012) (**Figure 44**). Ces ADRs étaient d'abord associées à la M184V et aux principales mutations des INNTIs, chez 60% des patients. La fréquence des TAMs était moins élevée (< 20%).

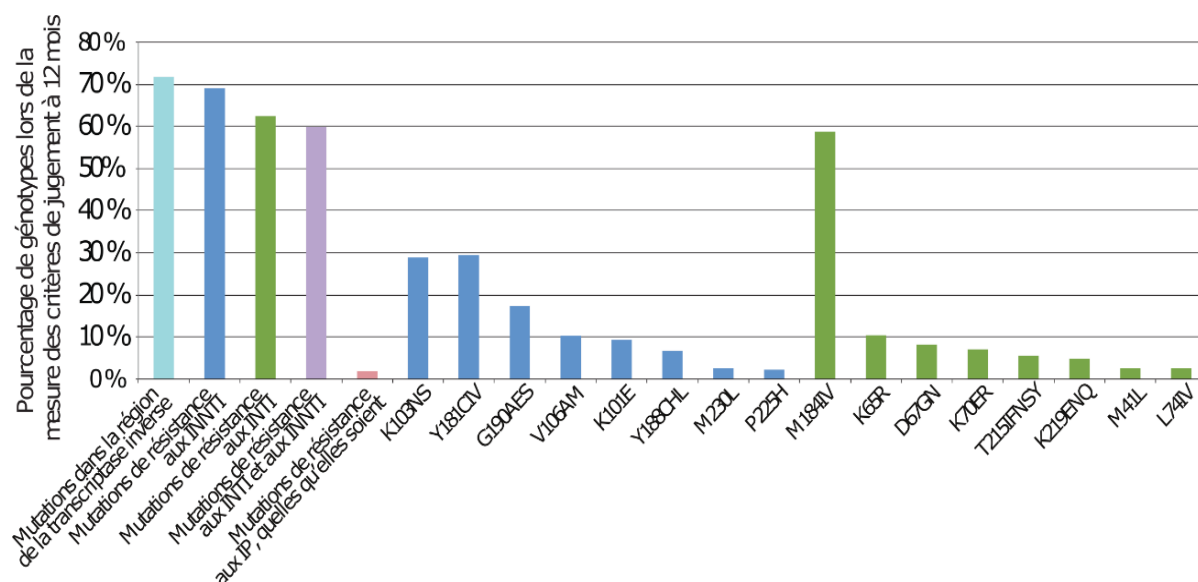


Figure 44. Prévalence des mutations de résistance acquises (ADR).

Enquêtes OMS, 2007-2010 (n=5 066) (modifié d'après OMS, 2012).

Des données un peu plus récentes (2009-2011) ont observé les mêmes prévalences après 12 mois de TAR, tout en mettant en évidence une hétérogénéité entre les pays (**Tableau 4**) (Aghokeng et al., 2014). Après 24 mois, une augmentation (75-86%) de la prévalence des ADRs, associée à une accumulation et une augmentation des TAMs est observée (Aghokeng et al., 2014; Messou et al., 2013). Il existe encore très peu de donnée sur l'ADR à plus long terme, mais les premières observations montrent des niveaux de résistance inquiétants, variant entre 82-90% au Cameroun et au Mali, après 36 mois de TAR (Aghokeng et al., 2013; Fofana et al., 2014). Dans certains pays où la prévalence rapportée des ADRs était déjà élevée après 12 mois, comme au Togo, une récente étude a montré que parmi 40% des patients en échec virologique après plus de 4 ans de TAR, la quasi-totalité d'entre eux avaient des ADRs (Konou et al., 2015a).

Récemment, l'impact de l'introduction du TDF dans le TAR de 1^{ère} ligne en remplacement de l'AZT vient d'être analysé (**Figure 45**) (TenoRES, 2016). Cette méta-analyse comprend 287 études (1998 et 2015) et presque 2000 patients sous TAR vivant dans plus de 36 pays différents à travers le monde (2016). Elle a observé une grande différence de prévalence de la résistance au TDR (K65R principalement) entre les pays d'Afrique sub-saharienne (28-50%) et les pays du Nord (0-25%). Comme la plupart de ces patients avaient une résistance aux autres molécules de leur TAR, celui-ci n'était fonctionnellement pas efficace. Ainsi, il est possible que dans certains pays d'Afrique sub-saharienne, l'émergence de la résistance sous TAR soit en train de s'aggraver avec l'introduction du TDF.

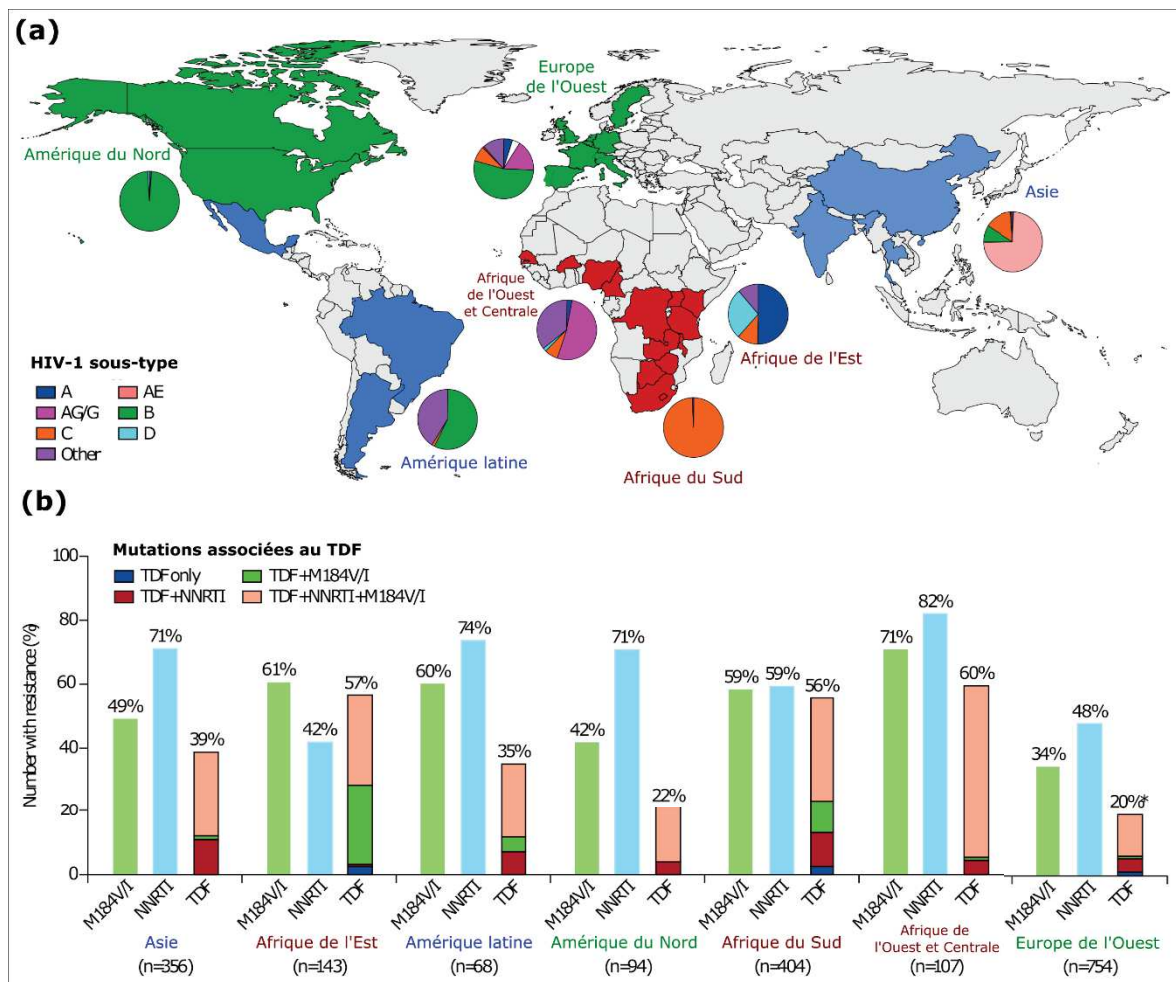


Figure 45. Résistances acquises du VIH au TAR.

(a) détail des pays analysés et diversité génétique du VIH-1, (b) prévalence des ADR par région. NNRT = inhibiteur non nucléosidique de la RT, TDF = Ténofovir disoproxil fumarate. Les pays du Nord sont indiqués en vert. Les pays du Sud sont indiqués en bleu, et parmi eux, l'Afrique sub-saharienne est indiquée en rouge (modifié d'après TenoRes study group, 2016).

Objectifs des Travaux de thèse

Quinze ans après la mise en place et l'accès élargi au TAR de 1^{ère} ligne dans les pays du Sud, la suppression virale, objectif clé de son efficacité, n'est pas atteinte chez une proportion importante de patients infectés par le VIH. De façon générale, environ 20% des patients sont en échec virologique (CV > 1 000 copies/mL) après 24 mois de TAR, et probablement plus ensuite, même si peu de données sont disponibles. Par ailleurs, cette proportion varie parfois énormément entre les pays et les zones démographiques (urbaines et décentralisées), en fonction notamment : des conditions programmatiques de gestion du TAR et du fonctionnement des systèmes de santé et des infrastructures de laboratoire disponibles. Finalement, de nombreuses mutations de résistance du VIH au TAR de 1^{ère} ligne composé par 1 INNTI et 2 INTIs sont fréquemment observées chez les patients en échec virologique. Dans les pays du Sud, la prise en charge et le suivi des patients infectés par le VIH ont évolué au fil des recommandations de l'OMS qui suivent une approche de santé publique. Contrairement aux pays du Nord, où la mise en place d'un TAR souvent plus puissant et plus robuste couplée à un suivi virologique de routine peut permettre de limiter l'émergence de la résistance, la situation actuelle des pays du Sud est bien plus préoccupante. En effet, la résistance acquise a tendance à y être plus élevée et elle augmente avec l'élargissement de l'accès au TAR. La résistance transmise augmente aussi en Afrique sub-saharienne avec l'élargissement de l'accès au TAR.

L'accès au TAR a pourtant représenté une véritable révolution dans la prise en charge des patients, en améliorant leur qualité de vie et évitant de nombreux décès liés au VIH/SIDA. Il a aussi permis de réduire considérablement la transmission du VIH au niveau mondial. Parmi environ 37 millions de patients infectés par VIH dans le monde en 2015 (dont 70% vivent en Afrique sub-saharienne), l'OMS estime que seulement 17 millions d'entre eux bénéficient d'un TAR. La couverture en TAR est donc insuffisante et disparate, à la fois entre les pays du Nord et du Sud mais également au sein du continent africain, entre l'Afrique de l'Est et du Sud (54%) et l'Afrique de l'Ouest et Centrale (28%). Actuellement, l'épidémie de VIH/SIDA est à un nouveau tournant de son histoire. Pour la première fois, il semble qu'en accélérant l'accès au TAR d'ici à 2030, il soit possible d'y mettre fin en tant que menace de santé publique, d'après les objectifs « 90-90-90 » de l'ONUSIDA et de l'OMS. Brièvement, ils impliquent d'abord que d'ici à 2020 : 90% des infections soient diagnostiquées, 90% de ces patients bénéficient d'un TAR ininterrompu, 90% des patients traités soient en succès virologique durable. Pour atteindre ces objectifs ambitieux, des changements majeurs sont indispensables, notamment l'accès rapide à la charge virale de routine à grande échelle. Dans ce contexte, la recherche virologique appliquée dans les pays du Sud est plus que nécessaire. Elle permet notamment de recueillir des

données manquantes et dissemblables aux pays du Nord, qui sont liées à la différence de prise en charge et de suivi des patients. Ce type de recherche vise aussi à transférer des techniques adaptées au contexte des pays du Sud, ainsi qu'à développer et tester des stratégies alternatives.

Face au risque d'émergence de résistance, il est indispensable d'étudier les résistances acquises du VIH aux ARVs chez les patients en échec de 1^{ère} ligne, particulièrement chez les patients traités depuis longtemps (> 3 ans). Ces données encore peu nombreuses sont nécessaires pour évaluer l'impact sur les TAR de 2^{ème} ligne, rarement administrés dans les pays du Sud, ainsi que le risque potentiel de transmission de souches résistantes chez les nouveaux patients infectés. Les études de virologie étant généralement menées en ville, il est aussi important d'évaluer l'efficacité des programmes et services de TAR dans les zones décentralisées pour savoir comment cela se passe aujourd'hui. Concernant l'accès à la charge virale, il est intéressant d'élargir la disponibilité des tests réalisables sur les plateformes complexes à partir de plasma, notamment avec des tests « ouverts » et polyvalents qui soient capables de détecter tous les variants VIH circulant dans les pays du Sud, et de faire diminuer le coût en réactifs et équipements. En l'absence actuelle de tests simples (POC, *point of care* en anglais), il est aussi urgent d'étudier l'applicabilité à grande échelle des prélèvements alternatifs, comme le sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais), qui visent à rendre la charge virale accessible dans les endroits où les infrastructures de laboratoires sont limitées.

L'objectif général était d'étudier les résistances du VIH-1 acquises après une longue durée de TAR de 1^{ère} ligne en zones urbaines et décentralisées, ainsi que d'évaluer la faisabilité d'un nouveau test de charge virale ouvert et polyvalent universel sur plasma et sur DBS, afin d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients vivant dans les pays du Sud.

Quatre objectifs spécifiques ont été définis et sont chacun présentés dans les chapitres des travaux de thèse, qui ont été menés dans les laboratoires de virologie de l'IRD-CREMER (Yaoundé, Cameroun) et de l'UMI233 TransVIHMI (Montpellier, France).

Dans le **Chapitre 1**, nous avons analysé en détail les mutations de résistance du VIH aux ARVs et les valeurs de charge virale observées chez des patients en échec virologique d'un TAR de 1^{ère} ligne administré depuis une longue durée. Cette étude transversale descriptive a été menée dans trois pays d'Afrique sub-saharienne (Cameroun, Burkina-Faso et Sénégal) où en pratique, le suivi des patients sous TAR est essentiellement clinique. Ici, notre premier objectif était d'évaluer l'impact des résistantes acquises sur le TAR de 2^{ème} ligne en zone urbaine dans le contexte des pays du Sud.

Dans le **Chapitre 2**, nous avons ensuite évalué l'efficacité réelle des programmes et services de TAR, en dehors des zones urbaines (zones décentralisées) où peu de données sont disponibles. Nous avons mené une étude transversale descriptive chez les patients de la file active d'un hôpital de district du Cameroun, en analysant l'échec virologique et les mutations résistances.

Les résultats des **Chapitres 1 et 2** ont clairement montré que l'accès à la charge virale en routine est actuellement crucial pour le succès des programmes de TAR dans les pays du Sud. A la suite de ces observations, la deuxième partie des travaux porte sur l'amélioration de l'accès à la charge virale pour tous les patients.

Dans le **Chapitre 3**, nous avons donc transféré un test de CV ouvert et polyvalent universel au sein du laboratoire de virologie du CREMER au Cameroun. Ce test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor est capable de détecter tous les variants du VIH-1 M, les groupes divergents N, O et P circulants au Cameroun, ainsi que leurs ancêtres simiens SIVcpz et SIVgor. Notre troisième objectif était d'évaluer le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor sur plasma dans le cadre du suivi virologique de routine, en le comparant au test commercial Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, USA, IL).

Enfin, dans le **Chapitre 4**, nous avons cherché à savoir comment le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor peut être adapté à une application optimale à grande échelle sur les prélèvements DBS. Notre quatrième objectif était de comparer différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques pour réduire l'impact de l'ADN pro-viral afin d'améliorer la spécificité des tests de charge virale réalisés sur DBS. Les valeurs de charge virale obtenues sur DBS ont été comparées à celles mesurées à partir du plasma, en utilisant notamment le seuil d'échec virologique de 1 000 copies/mL, qui vient d'être recommandé par l'OMS.

TRAVAUX DE THESE

DEUXIEME PARTIE

Contexte : situation épidémiologique et prise en charge de l'infection à VIH/SIDA dans les pays où les travaux de thèse ont été réalisés.

Burkina-Faso

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé, sans littoral, situé en Afrique de l'Ouest. D'une superficie d'environ 270 000 km², il partage ses frontières avec 6 pays : Mali (Nord et Ouest), Niger (Est), Bénin (Sud-est), Togo et Ghana (Sud) et Côte d'Ivoire (Sud-Ouest). La population burkinabé était d'environ 14,0 millions d'habitants (dont 47% avaient moins de 15 ans) en 2006, et d'après ce chiffre il a été estimé qu'elle serait d'environ 19 millions en 2016⁵. En outre, elle réside essentiellement en milieu rural (77%).

Le nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA au Burkina Faso est de 95 000 (79 000 – 120 000) en 2015, dont 88 000 adultes et 7 700 enfants, d'après les estimations de l'ONUSIDA⁶. Ainsi, la prévalence de l'infection à VIH/SIDA dans la population adulte (15-49 ans) est de 0,8% (0,7-1,0). Des précédentes études réalisées entre 2013 et 2014 ont observé des prévalences plus élevées chez certains groupes à risque : travailleuses du sexe (16,1%), HSH (3,6%) et détenus (3,0%)⁵. En 2015, on estime que l'incidence du VIH/SIDA est de 4 200 (2 300-6 300) et le nombre de décès est de 3 600 (2 500-4 900)². Le nombre de patients sous TAR est estimé à 52 300 environ, soit une couverture de 55% (45-67).

Les dernières recommandations nationales concernant la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH au Burkina Faso, suivent les recommandations 2013 de l'OMS et applique un seuil d'échec virologique de 3 000 copies/mL sur DBS⁷. Concernant l'accès à la CV, 8 sites auraient actuellement les capacités des réaliser les tests de CV parmi les 100 établissements de Santé assurant la prise en charge des patients vivant avec le VIH. Cependant, il est difficile d'obtenir des informations concernant le nombre de tests réalisés par an dans ce pays.

⁵ http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/BFA_narrative_report_2016.pdf

⁶ <http://aidsinfo.unaids.org/>

⁷ Normes et protocoles de prise en charge des personnes vivant avec le VIH au Burkina Faso, 4^{ème} édition, 2014.

Cameroun

Le Cameroun est un pays d'Afrique central doté d'une superficie de 475 650 km². Il est bordé par le golfe de Guinée (Sud-Ouest) et partage ses frontières avec 6 pays : Nigeria (Ouest), Tchad (Nord-Est), République Centrafricaine (Est) ; ainsi que République du Congo, Gabon et Guinée équatoriale (Sud). La population camerounaise était d'environ 19,0 millions d'habitants (dont 44% avaient moins de 15 ans) en 2005 et on estime qu'elle est d'environ 22,7 millions en 2016^{8,9}. Environ la moitié d'entre elle vit en milieu rural et en 2016, la population camerounaise est estimée à environ 22,7 millions d'habitants.

Le Cameroun fait face à une épidémie généralisée et il représente le 2^{ème} pays le plus affecté de la région d'Afrique Centrale et de l'Ouest, avec 620 000 (550 000 – 690 000) personnes vivant avec le VIH, dont 580 000 adultes et 39 000 enfants². La prévalence de l'infection à VIH/SIDA dans la population adulte (15-49 ans) est de 4,5 % (3,9-5,0) en 2015, d'après les estimations de l'ONUSIDA. Elle est plus élevée chez les femmes (5,3%) que chez les hommes (3,6%). En 2011, l'enquête démographique de santé avait aussi mis en exergue des disparités de l'épidémie entre les zones urbaines (4,8%) et rurales (3,8%), ainsi qu'entre les régions (**Figure 46**)¹⁰. De plus, des prévalences extrêmement élevées sont rapportées chez les HSH (37,2%) en 2015⁶. On estime que l'incidence du VIH/SIDA est actuellement de 44 000 (35 000-51 000) que le nombre de décès est de 33 000 (30 000-36 000). Le nombre de patients sous TAR atteint à peine 170 000, soit une couverture de 27% (24-30).

Les recommandations nationales concernant la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH au Cameroun ont été mises à jour en Janvier 2016 et visent à intégrer les dernières recommandations de l'OMS (C. Kouanfack, communication personnelle). Actuellement, 249 établissements de Santé assurent la prise en charge des patients vivant avec le VIH et 8 laboratoires maximum seraient en capacité de réaliser des tests de CV, avec la moitié situés à proximité des deux principales capitales (Douala et Yaoundé). En pratique, le test de CV n'est pas disponible en routine (Fokam et al. 2015). A titre indicatif, il a été estimé qu'environ 12% des patients VIH suivis dans un établissement de Santé avait bénéficié d'au moins une CV entre 2012 et 2015 (C. Kouanfack, communication personnelle).

⁸http://www.cnls.cm/docs/publications/PSN_2014_2017_CAMEROUN.pdf

⁹ Rapport d'activité du premier semestre 2016, CNLS, Août 2016

¹⁰ <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR260/FR260.pdf>

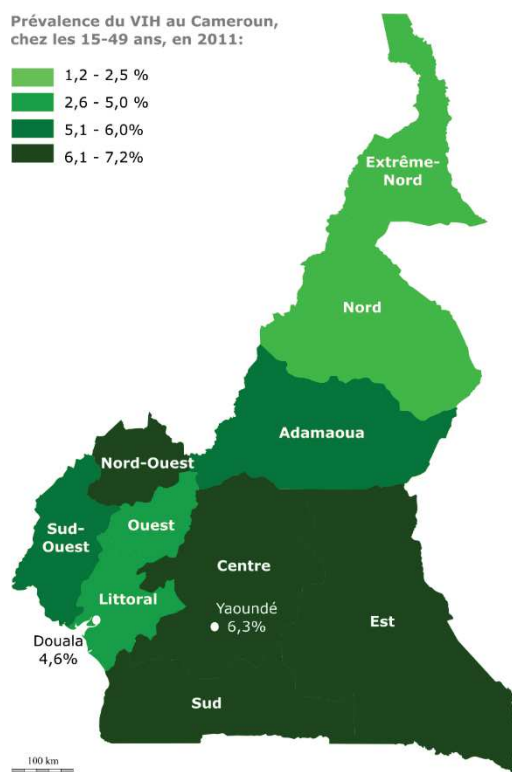


Figure 46. Prévalence du VIH au Cameroun chez les adultes, en 2011.¹⁰

Sénégal

Le Sénégal est un pays d'Afrique de l'Ouest mesurant une superficie de 196 722 km². Il est bordé par l'océan Atlantique et partage ses frontières avec 5 pays : Mauritanie (Nord), Mali (Est), Guinée et la Guinée-Bissau (Sud) ; ainsi que la Gambie qui forme une quasi-enclave dans le Sénégal. La population sénégalaise était d'environ 12,9 millions d'habitants en 2013, le Sénégal, avec des caractéristiques démographiques similaires aux Cameroun et Burkina Faso concernant la jeunesse (43% de moins de 15 ans) et la ruralité des populations (55%)¹¹. En 2015, elle serait estimée à 14,3 millions.

Le nombre de personnes vivant avec le VIH au Sénégal est d'environ 46 000 (38 000-56 000), avec 41 000 adultes et 4 800 enfants⁶. Ce pays est caractérisé par une épidémie concentrée avec une prévalence faible et stable de 0,5% (0,4-0,6) dans la population générale mais élevée chez certaines populations à risque : travailleuses du sexe (18,5% en 2010), HSH (21,8% en 2007) ; et les UDI (9,4% en 2011)¹⁰. Le nombre de patients sous TAR est estimé à plus de 18 000, soit une couverture de 40% (34-49).

¹¹ <http://www.cnls-senegal.org/pdf/2015/PSN%202014-2017.pdf>

Chapitre 1.

Les charges virales élevées et les multi-résistances liées aux changements tardifs de traitement antirétroviral de 2^{ème} ligne pourraient être un obstacle majeur à la réalisation des objectifs « 90-90-90 » de l'ONUSIDA en Afrique sub-saharienne

Résumé

Dans le contexte de l'initiation du traitement antirétroviral (TAR) dès que possible et de l'élimination de l'épidémie de VIH/SIDA en tant que menace de santé publique en 2030, il est important d'évaluer le risque potentiel de transmission de résistance du VIH-1 aux ARVs dans les pays du Sud. Comme la transmission est liée à la charge virale (CV) ARN du VIH-1, nous avons étudié l'association entre la CV plasmatique et les profils de résistance chez 451 adultes en échec de TAR de 1^{ère} ligne inclus dans l'essai 2LADY-ANRS12169/EDCTP au Burkina Faso, au Cameroun et au Sénégal.

La durée médiane de TAR était de 49 mois (EI : 33-69) et 91% des patients étaient asymptomatiques. Les tests génotypiques de résistance ont été réalisés avec succès chez 446 patients, et 98,7% d'entre-eux étaient résistants à au moins une molécule antirétrovirale de 1^{ère} ligne : 40,6 % et 55,8% étaient respectivement résistants à deux ou trois molécules de leur TAR en cours. La CV médiane était plus élevée chez les patients ayant des souches résistantes à toutes les molécules de leur TAR que chez ceux ayant des souches encore sensibles à au moins une molécule, avec respectivement : 4,7 log₁₀ copies/mL (EI : 4,3-5,2) versus 4,2 log₁₀ copies/mL (EI : 3,7-4,7) ($p < 0,001$). La proportion de patients avec des souches résistantes à toutes les molécules de leur TAR était plus élevée (77,9% (95/122)) chez les patients avec une CV > 5,0 log₁₀ copies/mL. Des prévalences élevées de résistances croisées aux autres inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ont été observés et elles étaient aussi plus élevées chez les patients qui avaient des CV élevées.

Sans amélioration du suivi des patients pour éviter des changements tardifs vers des 2^{ème} lignes de TAR, une nouvelle épidémie potentielle causée par des souches résistantes pourrait émerger en Afrique sub-saharienne et compromettre les efforts réalisés pour atteindre l'objectif « 90-90-90 » de l'ONUSIDA en 2020.

Article : version de l'éditeur/PDF adaptée à la thèse

AIDS Research and Human Retroviruses (ARHR). June 2016, ahead of print.
doi:10.1089/AID.2016.0010

High viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives in sub-Saharan Africa.

Emilande Guichet, MSc¹, Avelin Aghokeng, PhD^{1,2}, Laetitia Serrano, PhD¹, Guillaume Bado, MSc³, Coumba Toure-Kane, PhD⁴, Sabrina Eymard-Duvernay, MSc¹, Christian-Julian Villabona-Arenas, PhD^{1,5}, Eric Delaporte, MD PhD¹, Laura Ciaffi, MD¹, Martine Peeters, PhD¹ and the 2LADY-study group*.

1. UMI233-TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), INSERM U1175, University of Montpellier, Montpellier, France. 2. Centre de Recherche sur les Maladies Emergentes et Réémergentes (CREMER), Virology laboratory IMPM-IRD, Yaoundé, Cameroon. 3. Day Care Unit, University Hospital Sourou Sanou, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 4. Laboratory de Bacteriology-Virology, University Cheikh Anta Diop of Dakar, Dakar, Senegal. 5. Institut de Biologie Computationnelle (IBC), LIRMM, University of Montpellier, Montpellier, France. *The 2LADY study group members are listed in the acknowledgements.

Abstract

In the context of lifelong antiretroviral treatment (ART) as early as possible and to end the HIV/AIDS epidemic as a public health treat by 2030, it is important to evaluate the potential risk of transmission of HIV-1 drug resistance (HIVDR) in resource limited countries (RLCs). Since HIV transmission is driven by HIV-1 RNA viral load (VL), we studied the association between plasma VL and HIVDR profiles in 451 adults failing first-line ART from the 2LADY-ANRS12169/EDCTP trial in Burkina Faso, Cameroon and Senegal.

Median duration on first-line ART was 49 months (IQR: 33-69) and 91% patients were asymptomatic. Genotypic drug resistance testing was successful for 446 patients and 98.7% of them were resistant to at least one of the first-line drugs; 40.6% and 55.8% were resistant to two or three drugs of their ongoing first-line ART, respectively. The median VL was higher in patients with HIVDR to all ongoing first-line drugs than in those still susceptible to at least one drug; 4.7 \log_{10} copies/mL (IQR: 4.3-5.2) versus 4.2 \log_{10} copies/mL (IQR: 3.7-4.7), respectively ($p < 0.001$). The proportion of patients with HIVDR to all ongoing first-line drugs was highest (77.9% (95/122)) in patients with VL $> 5.0 \log_{10}$ copies/mL. High rates of cross-resistance to other nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) were observed and were also highest in patients with high VL.

Without improvement of patient monitoring to avoid late switch to second-line regimens, a potential new epidemic caused by HIVDR strains could emerge in sub-Saharan Africa and compromise all efforts to reach 90-90-90 UNAIDS objective by 2020.

Short communication

The major goal of the Joint United Nations AIDS Program (UNAIDS) is to end the HIV/AIDS epidemic as a public health treat by 2030. To achieve this, HIV transmission has to be reduced significantly and it should be ensured that by 2020, 90% of people living with HIV should know their HIV status and 90% of them should receive antiretroviral treatment (ART) intending to achieve viral suppression in 90% (UNAIDS, 2015). Therefore, WHO recommends now that all adults diagnosed with HIV should initiate ART, regardless of clinical stage or CD4 counts (WHO, 2015b). ART scale-up in resource-limited countries (RLCs) has been possible because countries adopted the WHO public health approach based on standardized and simplified first-line ART protocols with limited laboratory monitoring.

However, in the absence of HIV-1 RNA viral load (VL) monitoring, virological failure (VF) is not timely detected and switch to second-line regimens is delayed. People continue thus on failing ART and accumulate drug resistance mutations which can compromise efficacy of second-line ART and which can also be transmitted. Indeed, rates of transmitted HIV drug resistance (HIVDR) tend to increase over time and with wider ART coverage in RLCs (Hamers et al., 2013). Whereas the public health approach has been implemented with success in certain countries, high rates (>20%) of VF and HIVDR have been observed in others (Aghokeng et al., 2014). Moreover, in certain settings in sub-Saharan Africa, an alarming proportion of these VFs are due to HIVDR (Konou et al., 2015a). In the context of access to effective lifelong ART as early as possible, it is thus important to evaluate the potential risk of transmission of HIVDR in RLCs.

Although VL in genital secretions drives HIV transmission, plasma viral load predicts the risk of heterosexual transmission of HIV-1 (Baeten et al., 2011; Quinn et al., 2000). Here we studied the association between plasma VL and HIVDR profiles in order to evaluate the potential transmissibility of drug resistant HIV strains. The study was conducted in 451 adults failing first-line ART included in the 2LADY-ANRS12169/EDCTP trial, conducted in Burkina Faso (n=90), Cameroon (n=302) and Senegal (n=59), between January 2010 and September 2012.⁸ Treatment failure was defined as confirmed plasma VL >1,000 copies/mL (m2000 RealTime HIV-1 test, Abbott, USA) repeated after at least one month adherence support. After adherence support 13.8% (81/584) of patients had VL below 1,000 copies/ml. For the 451 patients that had still VL > 1,000 copies/mL the median duration on first-line ART was 49 months (IQR: 33-69) and the first-line ART drugs were; 3TC (lamivudine) for all, AZT

(zidovudine) or d4T (stavudine) for 85% and 15% respectively, EFV (efavirenz) or NVP (nevirapine) for 29% and 71% respectively. At diagnosis of VF and subsequent switch to second-line ART, 411 (91%) patients were asymptomatic despite median CD4 count of 183 cells/mm³ (IQR: 87-290) and median VL of 4.5 log₁₀ copies/mL (IQR: 4.0-5.1).

Protease and partial Reverse Transcriptase sequences from patients with VF were obtained as previously described and with the ANRS protocol (www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf) (Ciaffi et al., 2015). The ANRS-v25 algorithm (www.hivfrenchresistance.org/2015/Algo2015-hiv1.pdf) was used to predict drug resistance to the different ARV drugs. Protease and reverse-transcriptase regions were successfully amplified and sequenced for 446/451 patients and 98.7% (n=440) were resistant to at least one of the first-line drugs; 97.7% (85/87) in Burkina Faso, 99.0% (299/302) in Cameroon and 98.2% (56/57) in Senegal. Overall, 97.1% (n=433) were resistant to non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTIs) (412 to EFV and NVP, 21 to NVP only). Concerning nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs), 97.3% (n=434) were resistant to 3TC and 55.8% (n=249) to AZT and d4T. In practice, 2.2% (n=10), 40.6% (n=181) and 55.8% (n=249) patients were thus predicted to be resistant (i.e. scored as resistant and not as intermediate resistance) to one, two or three drugs of their ongoing first-line ART, respectively. In addition, 8.5% (n=38) patients were not yet predicted resistant to AZT and d4T but harbored already one (n=22) or two (n=16) thymidine analogue mutations (TAMs): M41L (n=5), D67N (n=6), K70R (n=32) or K219Q/E/N (n=11).

The median VL was higher in patients with HIVDR to all ongoing first-line drugs than in those still susceptible to at least one drug; 4.7 log₁₀ copies/mL (IQR: 4.3-5.2) versus 4.2 log₁₀ copies/mL (IQR: 3.7-4.7), respectively (p< 0.001, Mann-Whitney U test). The proportion of patients with HIVDR to all ongoing first-line drugs was higher in patients with high plasma VL; i.e. 25.5% (27/106), 58.3% (127/218) and 77.9% (95/122) when VL was between >3.0 - ≤4.0 log₁₀, >4.0 - ≤5.0 log₁₀ and >5.0 log₁₀ copies/mL, respectively (p< 0.01, multinomial logistic regression, adjusted on patient characteristics (study site, gender, WHO clinical stage, CD4 counts and time on ART)) (**Figure 46, A**).

Among the 249 patients resistant to AZT and d4T, 75.5% (n=188) accumulated NRTI mutations and harbored ≥ 2 TAMs in addition to M184IV. Moreover, 20.9% (52/249) patients

accumulated ≥ 5 TAMs and have a longer median ART duration, i.e. 63 months (IQR: 44-76). As a consequence, high rates of cross-resistance to other NRTIs were observed: 37.7% (n=168) to ABC (abacavir); 11.2% (n=50) to TDF (tenofovir) and 7.4% (n=33) to DDI (didanosine). Intermediate HIVDR to ABC and TDF was also predicted in 59.6% (n=266) and 10.8% (n=48) patients, respectively. The proportion of patients with NRTI cross-resistance was also higher in patients with high plasma VL; i.e. 35.8% (n=78/218), 8.3% (n=18/218) and 4.1% (n=9/218) when VL was $>4.0 - \leq 5.0$ log₁₀ copies/mL were resistant to ABC, TDF and DDI respectively versus 64.8% (n=79/122), 23.4% (n=29/122) and 18.0% (n=22/122) with VL >5.0 log₁₀ copies/mL ($p < 0.01$, multinomial logistic regression, adjusted on patient characteristics as mentioned above) (**Figure 46, B**).

Cross-resistance to other NNRTIs like RPV (rilpivirine) and ETR (etravirine) was observed in 56.1% (n=250) and 35.9% (n=160) patients, respectively; 15.9% (n=71) had also intermediate resistance to ETR. NNRTI cross-resistance was not associated with VL and was not always related to accumulation of mutations, because the presence of certain mutations was sufficient (ex. K101E/P (EFV, NVP, RPV), E138A/G/K/Q/R/S (RPV), Y181C/I/V (EFV, NVP, RPV, ETR) or H221Y (ETR/RPV)) according to the latest version of the ANRS algorithm. However, in our study all these mutations were observed in combination with other NNRTI mutations, except Y181C in 3.8% of patients only. The frequency of the different NRTI and NNRTI mutations are shown in **Figure 46, C**.

VL is the main predictor of sexual transmission of HIV-1 and in general transmission is low among persons with VL below 1,500 copies/ml but above this value, transmission increases with increasing VL (Quinn et al., 2000). Here we showed that in sub-Saharan Africa, high VL in patients on ART can also be associated with multidrug resistance and not only to non-adherence. Importantly, most of the failing patients (98.7%) have mutations conferring resistance to at least one of the first-line drugs but 90% were still asymptomatic and would have continued on failing ART based on clinical monitoring only. Consequently, the proportion of patients that are unaware of their VL status could contribute to the spread of HIVDR strains and reduce efforts of ART scale-up to prevent new HIV infections.

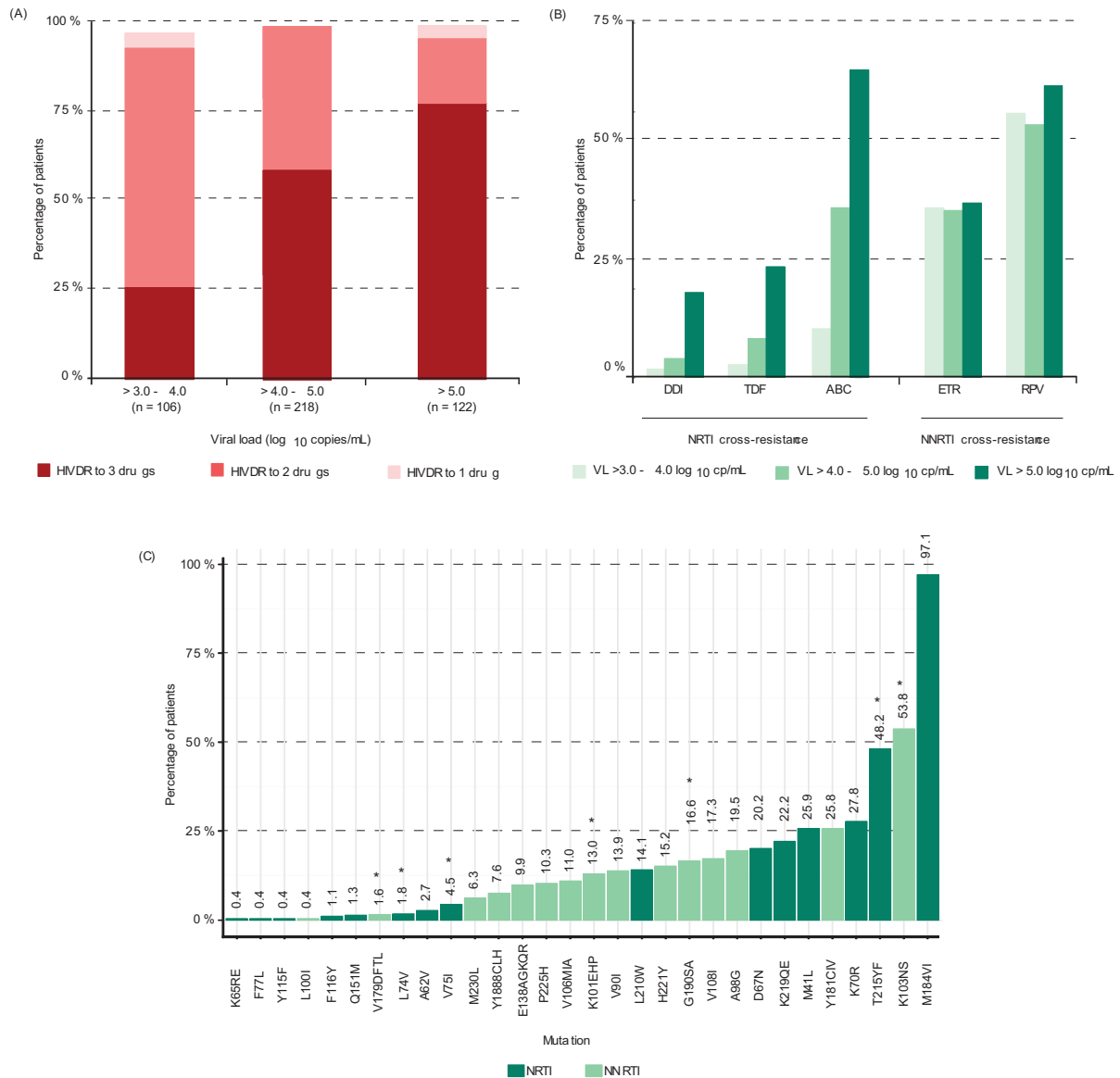


Figure 47. HIV-1 drug resistance (HIVDR) to first-line drugs (A) and cross-resistance (B) in patients with virological failure and successful genotyping according to plasma HIV viral load. Proportion of mutations from the IAS–2015 list associated with clinical resistance to reverse transcriptase inhibitors (C).

Mutations associated with resistance from the ANRS algorithm were documented at positions indicated by asterisk: V179I/M (7.8%), L74I (2.0%), V75A/M/T (1.3%), K101R (1.6%), G190Q/V (0.7%), T215A/I/S/V (2.0%) and K103H (0.2%) (N=446).

If ART scale-up continues without optimal patient monitoring and with use of antiretroviral drugs with a low genetic barrier in first-line ART, it can be expected that in certain RLCs a significant proportion of patients on long-term first-line ART will have high VL and harbor multidrug resistant strains. For example, assuming that the ART-naïve population is infected with wild-type HIV-1 variants, our observations point out to a prevalence of drug resistance ranging from 2.1% to 3.8% of all viremic individuals in 2012 for the studied countries

(UNAIDS 2015; Aghokeng et al., 2014). The proportion of viremic patients will be considerably lower in the context of ART coverage of 90% and as a consequence the overall likelihood to become infected will also be lower. However, the prevalence of drug resistance will increase among them and the chance to become infected with drug resistant HIV strains will be higher especially with a continued use of clinical and/or immunological patient monitoring in ART programs.

Despite the longer and broader ART coverage, the proportion of new infections with HIVDR strains could thus be higher in RLCs than in Europe or US where patients switch to second-line regimens before high VLs are reached (Saenz and Bonhoeffer, 2013). At present, transmitted HIVDR in RLCs concerns mainly resistance to NNRTIs, but it is likely that transmission of NRTI mutations will increase (Hamers et al., 2013; Yang et al., 2015a). Furthermore, the accumulation of HIVDR mutations and high VL due to late switch to second-line regimens not only boosts widespread transmission with HIVDR strains but also compromises efficacy of second-line drugs, for example several studies showed higher probability of early failure of second-line regimens in patients with high VL at switch (Boyd et al., 2015; Ciaffi et al., 2015). WHO recommends VL monitoring since 2013, but despite efforts to increase VL capacity, today access to VL testing remains largely insufficient.

With the new WHO recommendations, it is estimated that around 15 million additional individuals will need lifelong ART in the next five years in sub-Saharan Africa. In addition to provide rapidly wide access to VL monitoring more robust first-line regimens, based on new protease or integrase inhibitors, should also be recommended in RLCs. Scaling-up of VL monitoring needs also to be accompanied by training on optimal use of VL results for clinical decisions. Without such efforts people on failing ART represent a potential source for an epidemic with multidrug resistant strains that could delay the 90-90-90 UNAIDS objectives and overall worldwide HIV control.

Chapitre 2.

Echec virologique et résistance en zone rurale au Cameroun, au regard de l'objectif « 90-90-90 » de l'ONUSIDA

Résumé

Dans les zones rurales d'Afrique, il manque des données sur l'efficacité du traitement antirétroviral (TAR) afin d'évaluer l'écart avec les objectifs « 90-90-90 » de l'ONUSIDA. Nous avons donc étudié la prévalence de l'échec virologique et de la résistance du VIH aux antirétroviraux (ARVs), ainsi que le profil des mutations de résistance parmi les patients traités en routine dans un hôpital de district rural au Cameroun.

Une étude transversale a été menée entre Janvier 2013 et Janvier 2014 parmi les patients ≥ 15 ans et sous TAR ≥ 6 mois à l'hôpital de district de Mfou (région du Centre). Les patients ont bénéficié d'un accès gratuit au test de CV (Biocentric, Bandol, France). Le test génotypique de résistance était réalisé quand la CV $> 1\ 000$ copies/mL. Des modèles de régression logistique multivariée ont été utilisés pour étudier la relation entre l'échec virologique et la résistance du VIH aux ARVs, avec les caractéristiques socio-démographiques et médicales. Sur 407 patients (74,9% de femmes, âge médian de 41,8 ans, durée médiane de TAR de 29,2 mois), 96 (23,6%, IC 95%: 19.5-28.0) étaient en échec virologique et 74 (18.2%, IC 95% : 14.6-22.3) avaient des souches résistantes. Les prévalences d'échec virologique et de résistances du VIH aux ARVs augmentaient respectivement avec la durée de TAR, allant de : 12,0% et 8,0% pour le groupe « 6-12 mois » à 31,3% et 27,1% pour le groupe « > 72 mois ». Les 74 patients avec des résistances avaient tous des souches résistantes aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, et 57 d'entre-eux étaient aussi résistants aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse.

Nos estimations font partie des prévalences les plus élevées observées en Afrique Centrale et de l'Ouest. La proportion de patients en échec virologique doit être divisée par deux, afin d'atteindre l'objectif « 90-90-90 » de l'ONUSIDA. Le renforcement des capacités des systèmes de santé, la formation spécifique des personnels de santé concernant le VIH et l'utilisation des ARV, l'accès à la charge virale à grande échelle, et l'approvisionnement continu en ARVs sont importants, particulièrement en zone rurale. De plus, la surveillance de l'échec virologique et des résistances est cruciale pour préserver le futur.

Article : version de l'éditeur/PDF adaptée à la thèse

Open Forum Infectious Diseases, October 2016 accepted

Virologic failure and HIV drug resistance in rural Cameroon with regard to the UNAIDS 90-90-90 treatment targets

Charlotte Boullé*¹, Emilande Guichet*^{1,2}, Charles Kouanfack³, Avelin Aghokeng^{1,2}, Benjamin Onambany⁴, Catherine Massama Ikaka⁴, Emile Ngoek⁴, Landry Tsoumsta², Philippe Msellati¹, Eitel Mpoudi-Ngolé², Martine Peeters¹, Eric Delaporte¹, Christian Laurent¹

* CB and EG contributed equally.

¹ IRD, INSERM, Université de Montpellier, unité TransVIHMI, Montpellier, France.

² CREMER, Yaoundé, Cameroon.

³ Central Hospital, Yaoundé, Cameroon.

⁴ District hospital, Mfou, Cameroon.

Abstract

In rural Africa, data on virologic effectiveness of antiretroviral treatment (ART) are lacking to assess the gap with the UNAIDS 90-90-90 treatment targets. We therefore investigated the prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance, and the profile of genotypic resistance mutations among patients routinely treated in a rural district in Cameroon.

A cross-sectional study was performed between January 2013 and January 2014 among patients ≥ 15 years and on first-line ART for ≥ 6 months in the Mfou district hospital (Centre region). Patients were offered free access to HIV viral load testing (Biocentric, Bandol, France). Genotypic drug resistance testing was done when the viral load was >1000 copies/mL. Multivariate logistic regression models were used to assess the relationship of unsuppressed viral load or antiretroviral drug resistance with socio-demographic and medical characteristics. Of 407 patients (74.9% women, median age 41.8 years, median time on ART 29.2 months), 96 (23.6%, 95% confidence interval [CI] 19.5-28.0) had unsuppressed viral load and 74 (18.2%, 95% CI 14.6-22.3) had antiretroviral drug resistance. The prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance increased with time on ART, from 12.0% and 8.0% in the 6-12 months group to 31.3% and 27.1% in the >72 months group, respectively. All 74 patients with antiretroviral drug resistance were resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, and 57 of them were also resistant to nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Our estimations were among the highest observed in the west and central African region. The proportion of patients with virologic failure should be divided by two to reach the UNAIDS 90-90-90 treatment targets. Strengthening the health system capacities through HIV and ART-specific training of healthcare workers, laboratory equipments, and adequate drug supply is important, especially in the rural setting. Also, the surveillance of virologic failure and resistance will be crucial to preserve the future.

2.1 Introduction

Ending the AIDS epidemic by 2030 is the new goal endorsed by the global community (United nation, 2016). To achieve this goal, the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) issued a strategy in which antiretroviral therapy (ART) is a key element (UNAIDS 2014). This strategy aims that, by 2020, 90% of all people living with HIV will know their HIV serostatus, 90% of all people with diagnosed HIV infection will receive sustained ART, and 90% of all people receiving ART will have viral suppression (90-90-90 treatment targets). By 2030, the targets are 95%-95%-95%. Western and central Africa is the second most affected region with 6.5 million people living with HIV but one of the regions with the lowest ART coverage (28% in 2015) (UNAIDS, 2016b). Furthermore, the assessment of virologic effectiveness remains challenging because most patients are still treated without viral load monitoring, especially in rural settings.

In Cameroon, access to ART has been decentralized to district hospitals throughout the country since 2005 (Ministry of Public Health, 2004). Viral load measurement is recommended six months after ART initiation and then once a year by the national AIDS programme (Ministry of Public Health, 2015). However, this test is seldom performed because it is only available in major cities such as Yaoundé and Douala (the political and economic capitals, respectively) and its cost is supported by the patients (Fokam et al., 2015). Whereas virologic outcomes among patients receiving ART in urban areas have been widely studied since the beginning of ART use and scale-up in 2000, data in rural districts are lacking to assess the gap with the 90-90-90 treatment targets (Aghokeng et al., 2013, 2014; Kouanfack et al., 2009; Laurent et al., 2006; Soria et al., 2009; Zoufaly et al., 2014).

We therefore investigated the prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance, and the profile of genotypic resistance mutations among patients routinely treated in a rural district.

2.2 Methods

2.2.1 Study design

A cross-sectional study was performed between January 2013 and January 2014 among patients who received ART in the Mfou district hospital, which is located about 30 km to the south of Yaoundé. In this hospital, access to ART has been available since 2005. Antiretroviral regimen included two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Demographic and medical data were routinely recorded by social workers and physicians in individual paper medical charts, and then entered by a data clerk in an electronic database (ESOPE, Epiconcept, France). Patients were eligible for the study if they were 15 years or older and had started ART since at least 6 months. Eligible patients were offered free access to HIV viral load testing and, if necessary, to antiretroviral drug resistance testing. Patients with resistance had access to second-line ART. The National Ethics Committee of Cameroon approved the study. Informed consent was obtained for each included patient.

2.2.2 Laboratory testing

Whole blood samples were collected from included patients attending the Mfou district hospital and transported within six hours to Yaoundé to the reference HIV laboratory of IRD/CREMER (Centre de Recherche sur les Maladies Emergentes et Ré-émergentes), which is accredited by the World Health Organization (WHO) for HIV drug resistance testing. After centrifugation, plasma aliquots were stored at -20°C for further analyses. HIV-1 groups were identified with an in-house ELISA assay using V3-loop peptides from HIV-1 groups M, N, O and P (Villabona-Arenas et al., 2015). HIV-1 RNA was extracted automatically from 140 µL of plasma (Qiacube, Qiagen, Courtaboeuf, France) and viral load was measured using the HIV Generic Viral Load assay (Biocentric, Bandol, France). Genotypic drug resistance testing was done using an in-house protocol, which amplifies the protease and reverse transcriptase regions in a single *pol* gene fragment (~1300 bp) when the viral load was >1000 copies/mL (Guichet et al., 2016). To increase sensitivity of PCR amplification on samples with viral load between 300 and 1000 copies/mL, HIV-1 RNA extraction was performed from 500 µL of plasma and the reverse transcriptase region was amplified as a separate fragment.

PCR products were directly sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA). All sequences were checked for quality assurance analysis using the HIVdb Program (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>) before further analyses. Relevant drug resistance mutations were identified and interpreted using the ANRS-v25 interpretation rule (www.hivfrenchresistance.org/2015/Algo-2015.pdf). HIV-1 subtypes and recombinant forms were identified with phylogenetic tree analysis using the PHYML method (Guindon et al., 2010), and with breakpoint analysis for selected samples using SimPlot software-v3.5.1.0.

2.2.3 Statistical analysis

Unsuppressed viral load was defined as viral load >1000 copies/mL (WHO-recommended threshold), and antiretroviral drug resistance as the presence of a genotypic resistance to at least one antiretroviral drug. Individual characteristics were compared between included patients and non-included patients using the Chi-squared test for the categorical variables, and the Mann-Whitney test for the continuous variables. Multivariate logistic regression models were used to assess the relationship of unsuppressed viral load or antiretroviral drug resistance with socio-demographic and medical characteristics. Gender (women *versus* men), age (>35 *versus* ≤35 years), baseline CD4 cell count (≥100 *versus* <100 cells/μL), and time on ART (continuous variable) were forced in the multivariate analyses. Time on ART was computed as the number of years between initiation of ART and viral load measurement. Variables associated with outcomes with a *p*-value <0.25 in univariate analyses were entered into the complete multivariate models. A manual downward elimination procedure was then used to determine the final models. The goodness-of-fit of models was assessed using the conditional Bayesian Information Criterion (BIC). All analyses were performed using STATA 13.1 software (StataCorp, College Station, Texas, USA).

2.3 Results

2.3.1 Patients' characteristics

Of 1120 patients who had received ART in the Mfou district hospital, 702 (62.7%) were eligible for the study (**Figure 47**). Most patients who were not eligible had received ART for less than 6 months, the remaining either died, transferred-out or were less than 15 years. Of eligible patients, 407 (58.0%) were included. More than two thirds of patients who were eligible but were not included could not be reached because they did not answer phone calls.

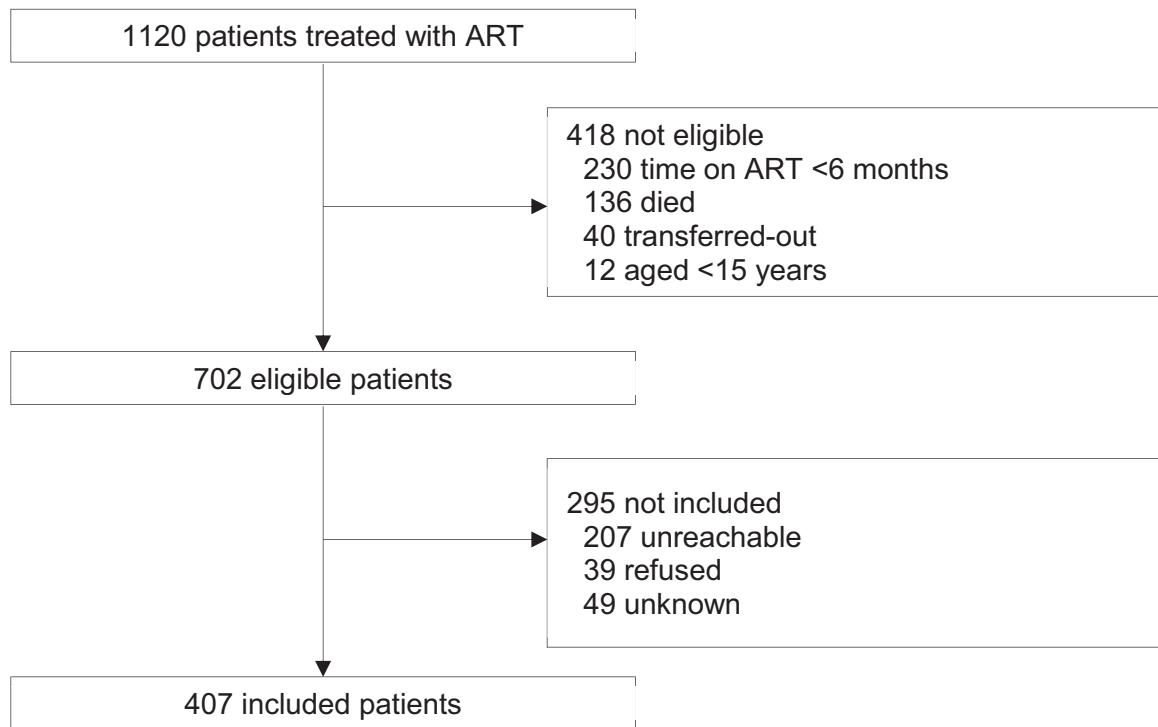


Figure 48. Study flowchart.

Of included patients, three quarters were women (**Table 5**). Median age was 41.8 years (interquartile range [IQR] 35.5-48.8). Most patients had started ART at an advanced stage of HIV disease (74.6% at WHO stage 3 and 6.1% at stage 4). Median baseline CD4 cell count was 170 cells/ μ L (IQR 95-246) among 341 patients (83.8%) with available data. Most characteristics were comparable between included patients and non-included patients, but the former had a slightly higher hemoglobin level (median 10.2 *versus* 9.9 g/dL) and had started ART a little earlier (~5 months). Median time on ART was 29.2 months (IQR 15.4-49.6).

Antiretroviral regimen included ZDV, TDF, or d4T + 3TC + EFV or NVP, with different distributions of regimen between ART initiation and the time of the study (**Figure 48**). Treatment had been changed once in 33.4% of patients, twice in 10.7%, three times in 2.6%, and fourth times in 0.8%. ART changes occurred after a median time of 17.3 months (IQR 7.4-29.9).

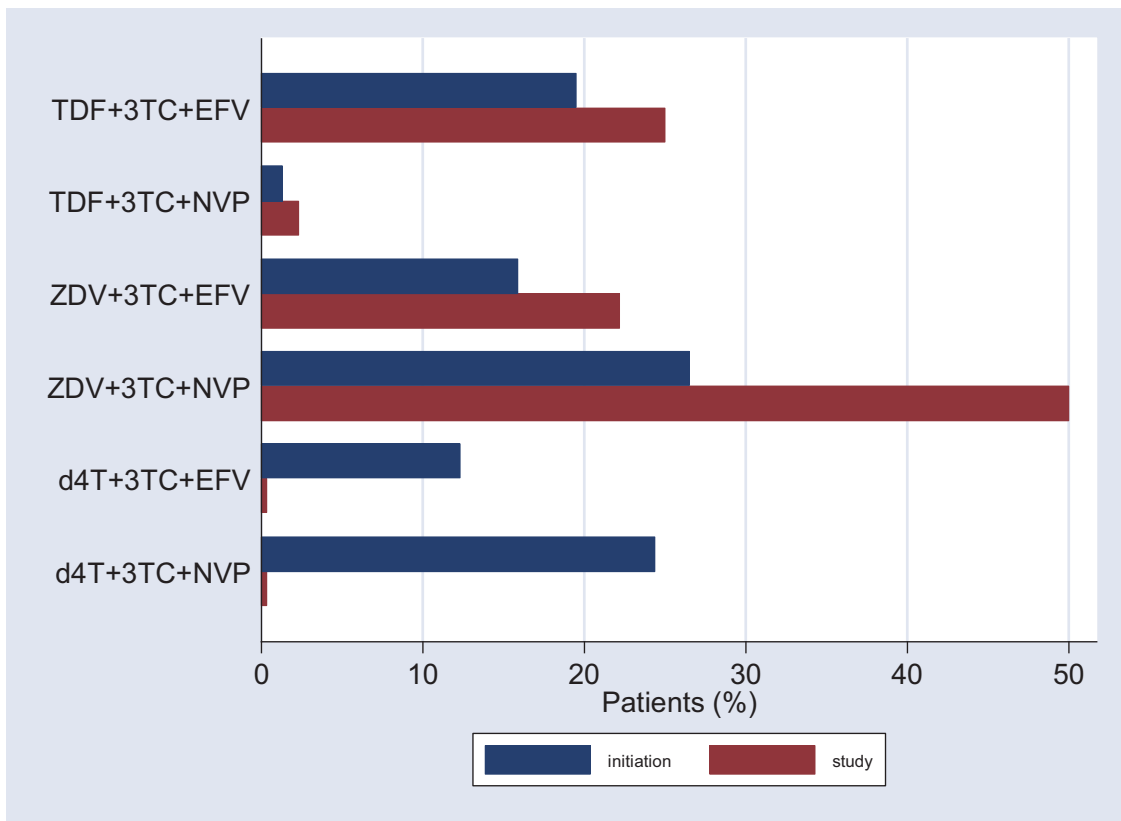


Figure 49. Antiretroviral regimen at treatment initiation and at the time of the study.

Table 5. Baseline characteristics of patients.

	Included (n=407)		Non-included (n=295)		<i>p</i>
	N	n (%) or median (IQR)	N	n (%) or median (IQR)	
Gender	407		295		0.607
Women		305 (74.9%)		216 (73.2%)	
Men		102 (25.1%)		79 (26.8%)	
Age (years)	406	41.8 (35.5-48.8)	291	41.4 (33.8-48.9)	0.347
School educational level	320		187		0.216
Never attended school		13 (4.1%)		12 (6.4%)	
Primary		103 (32.2%)		66 (35.3%)	
Secondary		180 (56.2%)		102 (54.6%)	
Higher		24 (7.5%)		7 (3.7%)	
Marital status	392		290		0.140
Single or divorced		196 (50.0%)		140 (48.3%)	
Married or cohabiting		148 (37.8%)		126 (43.5%)	
Widowed		48 (12.2%)		24 (8.3%)	
Bodyweight (kg)	371	58 (50-65)	280	56 (50-64)	0.222
WHO stage	394		295		0.335
1		35 (8.9%)		16 (5.4%)	
2		41 (10.4%)		28 (9.5%)	
3		294 (74.6%)		230 (78.0%)	
4		24 (6.1%)		21 (7.1%)	
CD4 cell count (cells/ μ L)	341	170 (95-246)	241	186 (88-275)	0.375
Hemoglobin (g/dL)	353	10.2 (9.0-11.7)	254	9.9 (8.4-11.2)	0.009
Date of ART initiation	407	30/10/2010 (27/03/2009-16/01/2012)	293	16/03/2011 (22/03/2009-24/05/2012)	0.015

Data are n (%) or median (IQR).

2.3.2 Virologic outcomes

Serotyping was successful for 390 patients and identified 389 infections with HIV-1 group M strains and one with a HIV-1 group O strain. However, the genotyping of the latter sample revealed a CRF02_AG strain, suggesting a dual infection or an infection with an O/M recombinant strain.

One hundred and twenty patients (29.5%) had a viral load >300 copies/mL. Of them, 96 had >1000 copies/mL, giving a prevalence of unsuppressed viral load of 23.6% (95% confidence interval [CI] 19.5-28.0). Genotyping was successful for 108 patients. Viral strains belonged to non-B subtypes (A, A3, D, F1 and G; 11% of cases), CRF02_AG (65%), other CRFs (CRF01_AE, CRF09_cpx, CRF11_cpx, CRF18_cpx, CRF22_01A1, CRF25_cpx, CRF37_cpx; 12%), and unique recombinant forms (12%). Of the 96 patients with viral load >1000 copies/mL, 74 (77.1%) had antiretroviral drug resistance. No patient with a viral load between 300 and 1000 copies/mL and successful genotyping (12/24) had resistance. The overall prevalence of resistance was 18.2% (95% CI 14.6-22.3). Median viral load was 5.1 log₁₀ copies/mL (IQR 4.3-5.7) among patients with unsuppressed viral load, and 5.1 log₁₀ copies/mL (IQR 4.5-5.7) among those with resistance.

The prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance increased with time on ART (**Figure 49**). This finding was confirmed by the logistic regression analyses, even after adjustment for gender, age, and baseline CD4 cell count (aOR 1.17, 95% CI 1.01-1.34, $p=0.033$ and aOR 1.23, 95% CI 1.05-1.43, $p=0.009$, respectively; **Table 6**). By contrast, the prevalences of both outcomes were lower among patients who had started ART with a CD4 cell count ≥ 100 cells/ μ L than among those with < 100 CD4 cells/ μ L (aOR 0.58, 95% CI 0.34-0.99, $p=0.047$ and aOR 0.52, 95% CI 0.29-0.94, $p=0.029$, respectively). Finally, the prevalences did not differ according to gender, age, school educational level, marital status, and baseline bodyweight, WHO stage, or hemoglobin level.

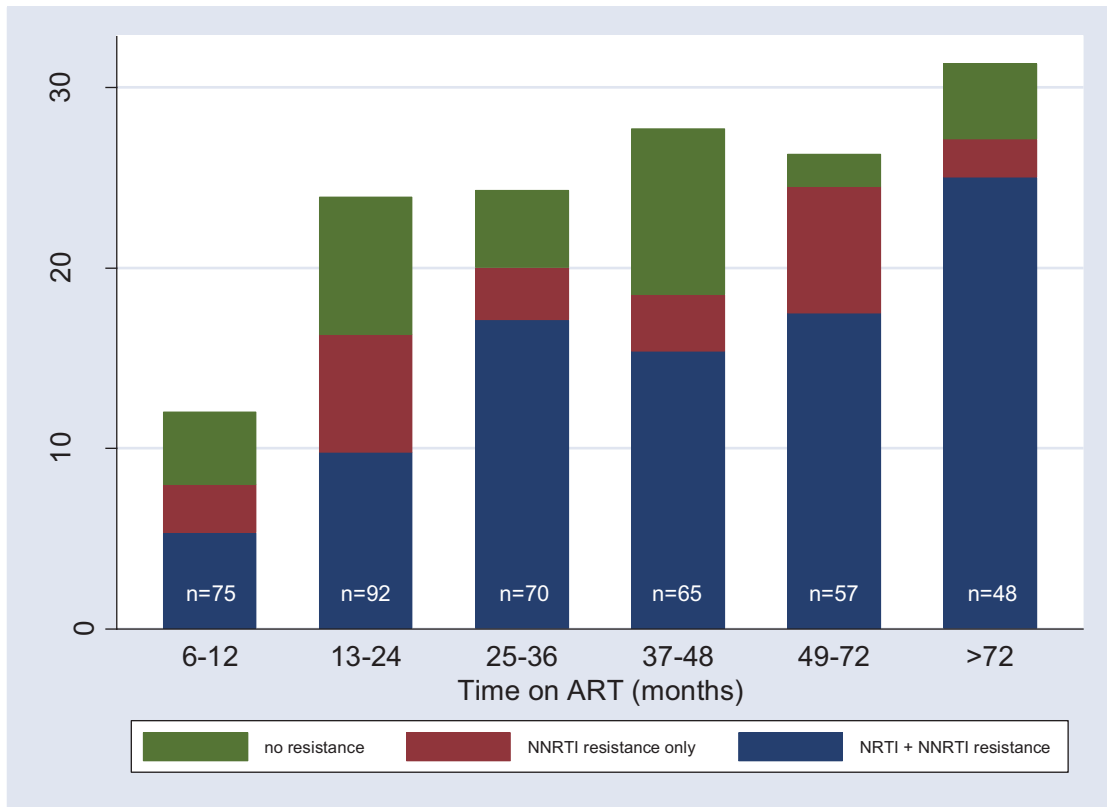


Figure 50. Prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance by time on ART.

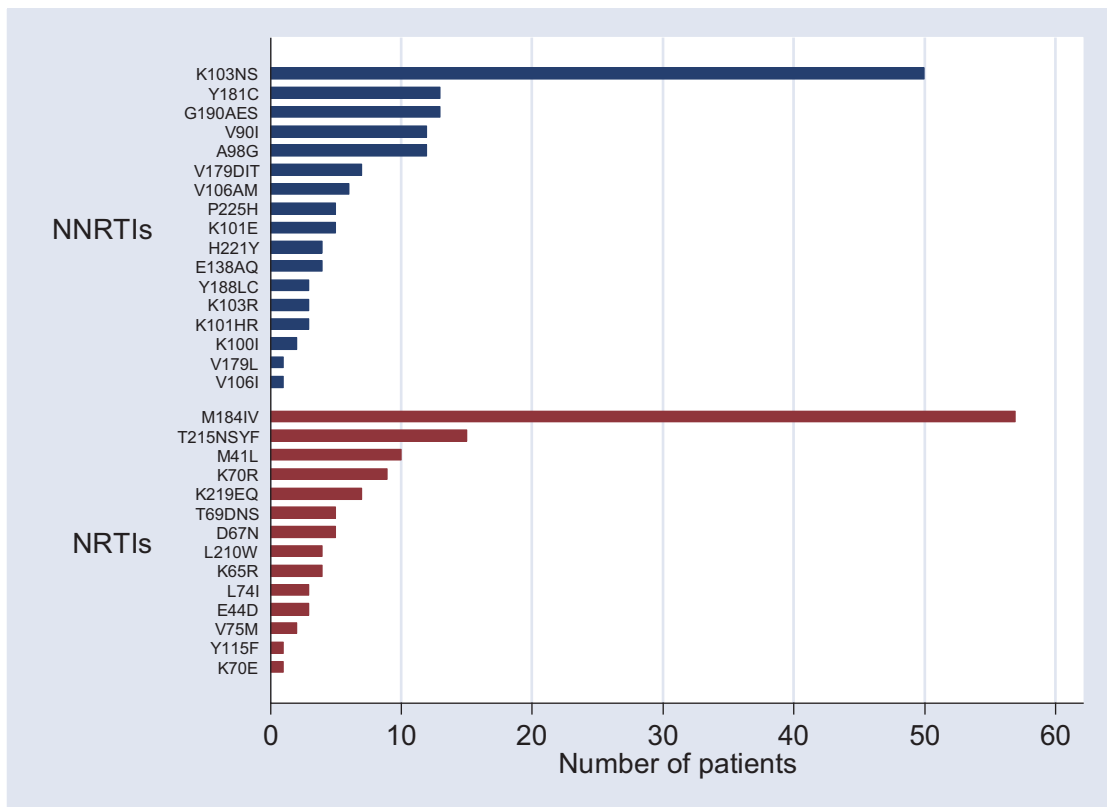


Figure 51. Genotypic NRTI and NNRTI-associated resistance mutations.

Table 6. Factors associated with unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance using logistic regressions.

	Viral load >1000 copies/mL						Resistance					
	Univariate			Multivariate			Univariate			Multivariate		
	OR	95% CI	<i>p</i>	aOR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	aOR	95% CI	<i>P</i>
Gender												
Male	1.00			1.00			1.00			1.00		
Female	0.87	0.52-1.46	0.601	0.92	0.51-1.63	0.768	0.88	0.50-1.56	0.666	0.95	0.50-1.80	0.872
Age (year)												
≤35	1.00			1.00			1.00			1.00		
>35	0.68	0.41-1.10	0.117	0.65	0.38-1.14	0.134	0.77	0.45-1.33	0.358	0.65	0.35-1.20	0.168
School educational level												
Less than secondary	1.00						1.00					
Secondary or higher	1.25	0.72-2.14	0.429				1.28	0.71-2.34	0.413			
Marital status												
Single or divorced	1.00						1.00					
Married or cohabiting	0.88	0.54-1.45	0.615				0.90	0.52-1.55	0.700			
Widowed	0.49	0.20-1.15	0.101				0.58	0.23-1.45	0.241			
Bodyweight (per 1-kg increase)	0.98	0.96-1.00	0.085				0.98	0.96-1.01	0.124			
WHO stage												
1 or 2	1.00						1.00					
3 or 4	1.44	0.76-2.71	0.260				1.84	0.87-3.89	0.111			
CD4 cell count (cells/μL)												
<100	1.00			1.00			1.00			1.00		
≥100	0.53	0.31-0.89	0.018	0.58	0.34-0.99	0.047	0.47	0.27-0.83	0.009	0.52	0.29-0.94	0.029
Hemoglobin (g/dL)												
<8	1.00						1.00					
8-10	0.63	0.28-1.39	0.248				0.61	0.26-1.42	0.248			
11-13	0.45	0.19-1.07	0.072				0.50	0.20-1.25	0.138			
≥14	0.83	0.23-2.97	0.778				0.57	0.13-2.47	0.454			
Time on ART (per 1-year increase)	1.13	1.01-1.27	0.032	1.17	1.01-1.34	0.033	1.19	1.05-1.34	0.006	1.23	1.05-1.43	0.009

All 74 patients with antiretroviral drug resistance were resistant to NNRTIs, and 57 of them (59.4% of patients with unsuppressed viral load, 14.0% of all patients) were also resistant to NRTIs. Patients with dual class resistance tended to be on ART for a longer time than those with NNRTI resistance only although the difference was not statistically significant (median time 3.4 years, IQR 2.0-5.2 *versus* 2.5 years, IQR 1.4-4.2; $p=0.101$). No resistance to protease inhibitors was detected. Of the 74 patients with NNRTI resistance, 73 were resistant to EFV and NVP, and one to NVP only. Twenty-three patients also had cross resistance to RPV and 15 to ETR. Of the 57 patients with NRTI resistance, all were resistant to 3TC and FTC. Twelve were also resistant to ZDV and d4T, four to ZDV, d4T, and TDF, four to TDF and d4T, and one to TDF alone. Nineteen had cross resistance to ABC and seven to ddI. The most prevalent genotypic mutations associated with resistance to NNRTIs were K103NS, Y181C, and G190AES, and those associated with resistance to NRTIs were M184IV, T215NSFY, and M41L (**Figure 50**).

Finally, of the 96 patients with unsuppressed viral load, 22 (23%) did not have antiretroviral drug resistance; 16 (17%) were on functional bi-therapy of 3TC and ZDV/d4T ($n=11$), 3TC and TDF ($n=4$), or ZDV and EVF ($n=1$); 38 (40%) were on functional monotherapy of ZDV/d4T ($n=33$) or TDF ($n=5$); and 18 (19%) had resistance to all the drugs of their regimen (regimen was unknown for 2 patients).

2.4 Discussion

This study in rural Cameroon showed that one fifth of patients had virologic failure after a median time on ART of 29 months. This figure is twice higher than that required to reach the 90-90-90 treatment targets. More precisely, 23.6% of patients had a viral load >1000 copies/mL and 18.2% had antiretroviral drug resistance. These estimations were higher than those observed in three district hospitals in Yaoundé in 2009-2011, where they were 13.9% and 10.4% after 24 months of ART, respectively (Aghokeng et al., 2014). By contrast, they were lower than in a district hospital located in a very remote area in north Cameroon in the same period 2009-2011 (38.6% and 28.9%, respectively) (Taieb et al., 2014). A pilot study performed in 2013 in two regions of Cameroon including the same region than the present study suggested

poorer performances for early warning indicators of antiretroviral drug resistance in rural than in urban settings, as well as at the primary district level as compared to secondary or tertiary level (Fokam et al., 2015). Thus, our study confirms that ART effectiveness is increasingly challenging with the remoteness in Cameroon. On the one hand, this might be due to patient-related factors such as longer distance and time to reach hospital, lower incomes, lower literacy, and poorer living conditions in rural settings. On the other hand, the lower ART effectiveness in rural settings might come from healthcare-related factors such as poorer knowledge and experience of healthcare workers in HIV/AIDS management and ART use, greater staff shortage (especially shortage of physicians and pharmacists), poorer laboratory infrastructures (to monitor ART effectiveness and adverse events), and higher frequency of drug stock-outs. It is however worth noting that a previous study in Cameroon reported a better adherence to ART among patients followed up in rural district hospitals than among those followed up in major hospitals in Yaoundé and Douala (Boyer et al., 2010).

As compared to other west and central African countries, our estimations were among the highest (Aghokeng et al., 2014; Diouara et al., 2014a; Messou et al., 2013; Muwonga et al., 2011). Interestingly, our estimations were comparable to those found in rural Togo but, by contrast to Cameroon, virologic failure tended to be comparable between rural and urban areas in this country (Aghokeng et al., 2013; Konou et al., 2015b). In rural Gabon, a very high proportion of patients (41.3%) had a viral load >1000 copies/mL, and 21.3% had resistance after a median time on ART of 34 months (Liégeois et al., 2012).

The prevalences of unsuppressed viral load and antiretroviral drug resistance were comparable between women and men, in accordance with some studies, including one in Yaoundé (Aghokeng et al., 2013; De Beaudrap et al., 2013; Liégeois et al., 2012). By contrast, men were more vulnerable to virologic failure than women in other studies (Kipp et al., 2010; Mosha et al., 2013; Muwonga et al., 2011; Penot et al., 2014). One of these studies was performed in nine district hospitals (including the Mfou one) in the same region of Cameroon than the present study (Boullé et al., 2015). The reason for the discrepancy between both studies is unclear.

The profile of genotypic resistances among patients receiving first-line ART was as expected (Boender et al., 2016a; Guichet et al., 2016). All patients with antiretroviral drug

resistance were resistant to NNRTIs, and three quarters of them were also resistant to NRTIs. The fixed-dose combination of d4T, 3TC, and NVP has been extensively used in the first years of the Cameroonian program (Laurent et al., 2004). In 2010, all patients on d4T were switched to ZDV or TDF. From 2010 to 2014, the first choice was ZDV, 3TC, and NVP/EFV while TDF was mostly prescribed for patients with anemia or those infected with hepatitis B virus. TDF-based regimen became the first choice thereafter (Ministry of Public Health, 2015). In the absence of routine resistance testing, patients with first-line ART failure are switched to second-line regimen including TDF if first-line treatment incorporated ZDV (and vice versa), 3TC, and boosted atazanavir or lopinavir. None of our patients had resistance to protease inhibitors. By contrast, four patients were resistant to both TDF and ZDV. Such patients in routine care therefore receive a functional monotherapy of boosted protease inhibitor and second-line ART could be less efficient. Importantly, nearly 20% of patients were susceptible to transmit resistant HIV because they had high viral loads and antiretroviral drug resistances. In the absence of resistance testing at ART initiation, patients infected with resistant HIV receive a standard first-line treatment and are likely to add to those with unsuppressed viral load.

Our findings should be interpreted taking into account several study limitations. First, we did not perform a second measurement of viral load three months apart, with adherence support as recommended by the WHO to define virologic failure. However, we performed resistance testing among patients with viral load >1000 copies/mL. The prevalence of virologic failure as defined by the WHO was therefore between 18.2% (proportion of patients with resistance) and 23.6% (proportion of patients with a single viral load >1000 copies/mL). Second, our estimations of prevalence should be seen as a minimum at the programme level because of the cross-sectional design and the exclusion of patients who were deceased (probably because of therapeutic failure), transferred-out (for instance to Yaoundé for getting second-line ART), or unreachable.

In conclusion, the proportion of patients with virologic failure should be divided by two to reach the UNAIDS 90-90-90 treatment targets. Strengthening the health system capacities through HIV and ART-specific training of healthcare workers, laboratory equipments, and adequate drug supply is important, especially in the rural setting. Also, the surveillance of virologic failure and resistance will be crucial to preserve the future.

Chapitre 3.

Evaluation « sur le terrain » d'un test de charge virale ouvert et polyvalent universel de RT-PCR quantitative VIH-1/SIVcpz/SIVgor pour le suivi virologique, en comparaison au test Abbott HIV-1 RealTime HIV-1, au Cameroun

Résumé

Avec l'augmentation des besoins en test de CV du VIH dans les pays du Sud, il est important de pouvoir disposer de tests à prix abordables et capables de quantifier les différents variants du VIH-1. Les valeurs de CV mesurées avec un test de RT-qPCR ouvert et polyvalent universel, récemment développé afin de détecter et quantifier tous les variants connus de la lignée VIH-1/SIVcpz/SIVgor, ont été comparées à celles obtenues avec le test Abbott RealTime HIV-1, dans un laboratoire national de référence au Cameroun.

Sur un total de 474 échantillons de plasma, caractérisés par une large gamme de CV et une grande diversité de VIH-1 groupe M, 97,5% de concordance a été observée, en utilisant la limite inférieure de détection de chacun des tests. Des CV plus élevée ont été mesurées avec le récent test, $+0,47 \log_{10}$ copies/mL (95% IC : 0,42-0,52), montré par l'analyse de concordance de Bland-Altman. En utilisant le seuil $3,00 \log_{10}$ copies/mL, recommandé par l'OMS pour définir l'échec virologique dans les pays du Sud, la concordance était égale à 94,7%, 360/474 contre 339/474 patients étaient en échec avec respectivement le nouveau test et le test Abbott RealTime HIV-1. Onze échantillons de patients en échec virologique n'étaient pas détectés avec Abbott RealTime HIV-1 contre seulement deux patients avec le nouveau test.

Finalement, notre étude a montré que le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor récemment développé pouvait être facilement transféré dans des laboratoires des pays du Sud expérimentés avec la technique de CV. De plus, il a montré de bonnes performances pour quantifier la grande diversité de variants du VIH-1 groupe M, dans le cadre d'un suivi virologique de routine.

Article : version de l'éditeur/PDF adaptée à la thèse

Journal of Virological Methods (VIRMET). September 2016, ahead of print.
doi:10.1016/j.jviromet.2016.09.005

Field evaluation of an open and polyvalent universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor quantitative RT-PCR assay for HIV-1 viral load monitoring in comparison to Abbott RealTime HIV-1 in Cameroon

Emilande Guichet ¹, Avelin Aghokeng ^{1,2}, Sabrina Eymard-Duvernay ¹, Nicole Vidal ¹, Ahidjo Ayoub ¹, Eitel Mpoudi Ngole ², Eric Delaporte ¹, Laura Ciaffi ¹, Martine Peeters ¹.

1. UMI233-TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), INSERM U1175, University of Montpellier, Montpellier, France.
2. Centre de Recherche sur les Maladies Emergentes et Réémergentes (CREMER), Virology laboratory IMPM-IRD, Yaoundé, Cameroon.

Abstract

With the increasing demand of HIV viral load (VL) tests in resource-limited countries (RLCs) there is a need for assays at affordable cost and able to quantify all known HIV-1 variants. VLs obtained with a recently developed open and polyvalent universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR were compared to Abbott *RealTime* HIV-1 assay in Cameroon.

On 474 plasma samples, characterized by a wide range of VLs and a broad HIV-1 group M genetic diversity, 97.5% concordance was observed when using the lower detection limit of each assay. When using the threshold of 3.00 log₁₀ copies/mL, according to WHO guidelines to define virological failure (VF) in RLCs, the concordance was 94.7%, 360/474 versus 339/474 patients were identified with VF with the new assay and Abbott *RealTime* HIV-1, respectively. Higher VLs were measured with the new assay, +0.47 log₁₀ copies/mL (95% CI; 0.42-0.52) as shown with Bland-Altman analysis. Eleven samples from patients on VF with drug resistance were not detected by Abbott *RealTime* HIV-1 versus two only with the new assay.

Overall, our study showed that the new assay can be easily implemented in a laboratory in RLCs with VL experience and showed good performance on a wide diversity of HIV-1 group M variants.

3.1 Introduction

Reducing the burden of HIV/AIDS remains a key public health challenge. The major objective of the Joint United Nations AIDS Program (UNAIDS) and the World Health Organization (WHO) is to end the HIV/AIDS epidemic as a public health threat by 2030 (UNAIDS, 2013). Therefore HIV transmission has to be reduced significantly and by 2020, 90% of people living with HIV should know their HIV status, 90% of them should receive antiretroviral treatment (ART) with 90% of them achieving viral suppression (UNAIDS, 2013). It is estimated that at least 17 million of the more than 37 million people living with HIV are receiving ART in 2015 (UNAIDS, 2016a), but to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives all individuals diagnosed with HIV should now receive ART. The initial scale-up of ART in resource-limited countries (RLC) was possible because they adopted the WHO public health approach which is based on standardized first and second-line regimens and clinical monitoring when biological monitoring was not possible (Gilks et al., 2006).

However, with this approach ART failure is not detected in a timely period and as a consequence high rates of virological failure (VF) and drug resistance with accumulation of numerous mutations are observed in various settings (Aghokeng et al., 2014; Boyd et al., 2015; Konou et al., 2015a; Stadel et Richman, 2012). Therefore, WHO recommends since 2013 viral load (VL) testing to monitor patients on ART (WHO, 2013). Although access to VL tests has increased, it remains largely insufficient in RLCs, especially in sub-Saharan Africa (Haas et al., 2015). The rapid expansion in ART coverage, necessary to reach the UNAIDS objective, creates also an urgent need for scale-up and strengthening of laboratory capacity for timely monitoring of HIV treatment. The low coverage of VL tests is due to cost and complexity of VL detection equipments, cost of reagents, need for human resource training and laboratory infrastructure as well as operational challenges in sample collection, transport and storage (Roberts et al., 2016; Rouet and Rouzioux, 2007).

Today, different viral load assays using various molecular detection and quantification techniques such as real-time RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), or bDNA (branched-chain DNA signal amplification) are commercially available (Fiscus et al., 2006; Rouet et al., 2011). Moreover,

‘in-house’ and generic real-time RT-PCR assays using open polyvalent platforms have also been developed (Aitken et al., 2013b; Li et al., 2010; Preiser et al., 2006; Rouet et al., 2008). These latter tests enable reduction of reagent costs and optimize the range chart of existing equipment to allow their use also with ‘in-house’ or generic assays for other pathogens. Another challenge for VL tests is the genetic diversity of HIV. Most commercial VL assays were primarily designed for HIV-1 group M subtype B, which is the most prevalent subtype in high-resource countries.

However, HIV-1 M non-B variants (subtypes and circulating (CRF) or unique (URF) recombinant forms) are the most prevalent in RLCs, and they represent 90% of all circulating HIV-1 strains worldwide (Hemelaar et al., 2011). Therefore efforts have been done to improve the capacity of VL assays to detect and quantify a wide diversity of HIV-1 strains. The number of commercially available assays that can detect and quantify to some extent HIV-1 group O increased also and assays to monitor HIV-2 VL have recently been developed (Rouet et al, 2011, Ruelle et al 2014, Avettand-Fenoel 2014). Nevertheless, quantification discrepancies leading to clinically significant differences still exist, because not all tests perform equally on the different HIV-1 variants and no VL assay is perfect (Mourez et al., 2015).

With the increasing demand of HIV viral load tests in RLCs, where a wide diversity of HIV-1 variants co-circulate, there is a need for assays at affordable cost and able to quantify all known HIV-1 variants. We recently developed and described an ‘in house’ quantitative RT-PCR assay, called HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR assay, that detects and quantifies a wide diversity of HIV-1 group M variants, the divergent HIV-1 group O, as well as the simian precursors of HIV-1; SIVcpz*Ptt*, SIVcpz*Pts* and SIVgor from chimpanzees and gorillas (Etienne et al, 2013). The test was initially compared with a previously validated Generic HIV Viral Load assay (Biocentric, Bandol, France) (Rouet et al, 2007; Rouet et al, 2010) on a panel of plasma samples known to represent a large diversity of HIV-1 group M subtypes and CRFs. The VLs were highly correlated ($r=0.95$) and the analytical specificity and sensitivity were 100% and 97.4%, respectively. Moreover, HIV-1 group O plasma samples were better quantified compared to the Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, IL, USA) (Etienne et al, 2013).

In the present study, we further evaluated the performance of this recently developed assay for its capacity to detect and quantify HIV-1 variants with the aim to implement the assay use in RLCs. Therefore, the assessment was conducted in Cameroon where all HIV-1 groups, numerous subtypes and CRFs co-circulate. Results were compared with VL obtained with an FDA-approved assay, Abbott RealTime HIV-1. This assay is widely used and known to detect and quantify a wide diversity of HIV-1 group M and O strains (Mourez et al, 2015; Ndiaye et al, 2015; Tang et al, 2007).

3.2 Material and Methods

3.2.1 Study population, sample collection and processing

The study was conducted in Cameroon in the CREMER Virology Laboratory in Yaoundé, Cameroon, a national reference laboratory and accredited by WHO for HIV antiretroviral resistance surveillance. HIV-1 RNA VL results were compared for 474 samples from HIV-1 positive patients on first-line antiretroviral treatment (ART). Patients were attending HIV services of the Central and Military Hospitals of Yaoundé in Cameroon for the screening visit prior to inclusion in the ANRS12169/2-LADY Trial, designed to evaluate the efficiency of different second-line ART regimens (Ciaffi et al, 2015). Whole blood was collected on EDTA tubes and sent within six hours to the laboratory of CREMER. After centrifugation, at least three plasma aliquots of 1 mL were stored at -80°C when sufficient material was available. One aliquot was used for routine VL testing with the Abbott RealTime HIV-1 (Abbott molecular, IL, USA), the second one was used for VL testing with the recently developed HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR assay and the last one was kept as backup for further analyses (i.e viral load control test, genotypic drug resistance testing). The freeze/thaw cycles until use were the same for each assay.

3.2.2 HIV-1 RNA viral load quantification

For the universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR assay, HIV-1 RNA was extracted from 140 μ L of plasma with the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol on the Qiacube instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) and eluted in 60 μ L. Standards covering a range of HIV RNA concentrations and positive and negative controls of the Generic HIV-1 viral load test (Biocentric, Bandol, France) were used as previously described and were extracted with the same protocol (Etienne et al, 2013). HIV-1 RNA quantification was done in a 20 μ l reaction volume containing 10 μ l of RNA extract, primers and the probe at 500 nM, 1X of TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) and RNase-free water to the final volume. Cycling conditions were as follows: reverse transcription at 50°C for 5 min, RT inactivation and initial denaturation at 95°C for 20 sec, and amplification with 50 cycles at 95°C for 3 sec and 58°C for 30 sec (Etienne et al, 2013). The 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA) was used for cycling and data acquisition. The lower detection limit (LDL) was estimated $\sim 2.70 \log_{10}$ copies/mL with a plasma input of 140 μ L.

The Abbott RealTime HIV-1 assay (Abbott Molecular, IL, USA) was done according to the manufacturer's protocol. HIV-1 RNA was extracted manually from 600 μ L of plasma using the *m*Sample preparation system (Abbott Molecular, IL, USA). Cycling and data acquisition were performed with the m2000rt Molecular Diagnostic Instrument (Abbott Molecular, IL, USA). The LDL of the Abbott RealTime HIV-1 assay was 1.60 \log_{10} copies/mL.

3.2.3 Genotyping and classification of HIV-1 variants

All samples were tested with a previously developed 'in-house' enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) using V3-loop peptides from the gp120 envelope region to identify infections with HIV-1 group N, O and P (Vergne et al., 2003; Villabona-Arenas et al., 2015). All samples with VL $\geq 3.00 \log_{10}$ copies/mL in at least one of the two VL assays were sequenced in the *pol* gene. Nucleic acids were manually extracted from 200 μ L of plasma using QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol.

Protease and RT were amplified as a single fragment (1281 bp) in the first round with previously described primers (Monleau et al, 2014). The forward primer was PR1 (HXB2 position 1958 to 1984, 5'-THAARTGTTTCAACTGTGGCAARGAAG-3'). Briefly, a one-step RT-PCR was performed with forward primer PR1 and reverse primer TR2as. Nested PCR was then performed using PR2 and TR3as. The amplification conditions and the enzymes used are the same as previously described (Monleau et al, 2014). PCR products were directly sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA). Identification of relevant HIV-1 drug resistance mutation (DRMs) and prediction of antiretroviral drug resistance were performed using the ANRS-v25 algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org/2015/Algo2015-hiv1.pdf>, accessed 06 January 2016). Phylogenetic tree analysis using the Maximum-likelihood method with PhyML (Guindon et al., 2010) and recombination analysis using similarity and bootscanning plots (Simplot software package version 3.5.1.0; 300-bp window size and 20 bp increment) were done to identify HIV-1 M subtypes and circulating (CRF) and unique (URF) recombinant forms (Lole et al., 1999).

3.2.4 Statistical analysis

All VL data were analyzed as \log_{10} -transformed values. To determine the linear relationship between the assays, the Pearson's correlation coefficient (r) was calculated. Bland-Altman analysis was used to assess the agreement between the two methods of viral load measurement (Bland and Altman, 1999). Correlation and Bland-Altman analyses were performed using pairs of quantifiable VL values.

3.3 Results

3.3.1 HIV-1 genetic diversity of the samples used in the comparative analysis

Among the 474 samples used for the VL comparisons, none reacted with peptides of HIV-1 group N, O and P when tested with the V3-loop peptide ELISA. A total of 362 samples had VL $\geq 3.00 \log_{10}$ copies/mL in at least one of the two VL assays. Genotyping was successful for 323 (89%) of them. For the remaining samples genotypes were not available due to insufficient material or PCR tests that failed. Phylogenetic and recombination analyses identified the following HIV-1 variants in decreasing order of importance: 180 (55.7%) CRF02_AG, 23 (7.1%) subtype G, 17 (5.3%) CRF22_01A1, 15 (4.6%) CRF11cpx, 12 (3.7%) subtype F (1 F1 and 11 F2), 11 (3.4%) subtype D, 11 (3.4%) subtype A (including 3 A3), 7 (2.2%) CRF13_cpx, 6 (1.9%) CRF09_cpx, 4 (1.2%) CRF18_cpx, 4 (1.2%) CRF37_cpx, 4 (1.2%) CRF01_AE, 2 (0.6%) subtype H, 1 (0.3%) CRF06_cpx and 26 (8.1%) URFs.

3.3.2 Comparison of the VL results between Abbott RealTime HIV-1 and the universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR.

We first compared the number of samples detected above the lower detection limit (LDL) of each assay. A total of 367/474 (77.4%) plasma samples had VL above the LDL of 1.60 \log_{10} copies/mL with the Abbott RealTime HIV-1 assay, and 361/474 (76.2%) samples were above the LDL of 2.70 \log_{10} copies/mL with the new assay. Of these, 358 (75.5%) had detectable VL loads in both assays. Despite the different lower detection limit, there was a concordance between detectable and undetectable HIV-1 RNA values for 462 (97.5%) of the 474 samples.

Overall, we observed thus 12 discordant samples, i.e. nine that were not identified with the new assay and three not detected with the Abbott RealTime HIV-1 assay. Among the nine samples not detected with the new assay, seven had VL measured below its lower detection limit of 2.70 \log_{10} copies/mL, i.e between 1.65 and 2.66 \log_{10} copies/mL with Abbott RealTime HIV-1. For the two other samples, VL values with Abbott RealTime HIV-1 were 3.67 and 4.65 \log_{10} copies/mL. However, when repeating VL test on new extracts, with the new assay on these

two samples: the first sample had a VL of 3.34 log₁₀ copies/mL (CRF13_cpx) but the second sample remained undetectable (CRF22_01AE). Finally, for the 3 samples not detected with the Abbott RealTime HIV-1 assay (1 CRF02_AG and 2 not amplified in *pol*), VLs were between 3.26 and 3.38 log₁₀ copies/mL with the new assay. **Figure 51** shows the correlation between the results of both assays (Pearson correlation coefficient $r=0.84$; $P < 0.001$).

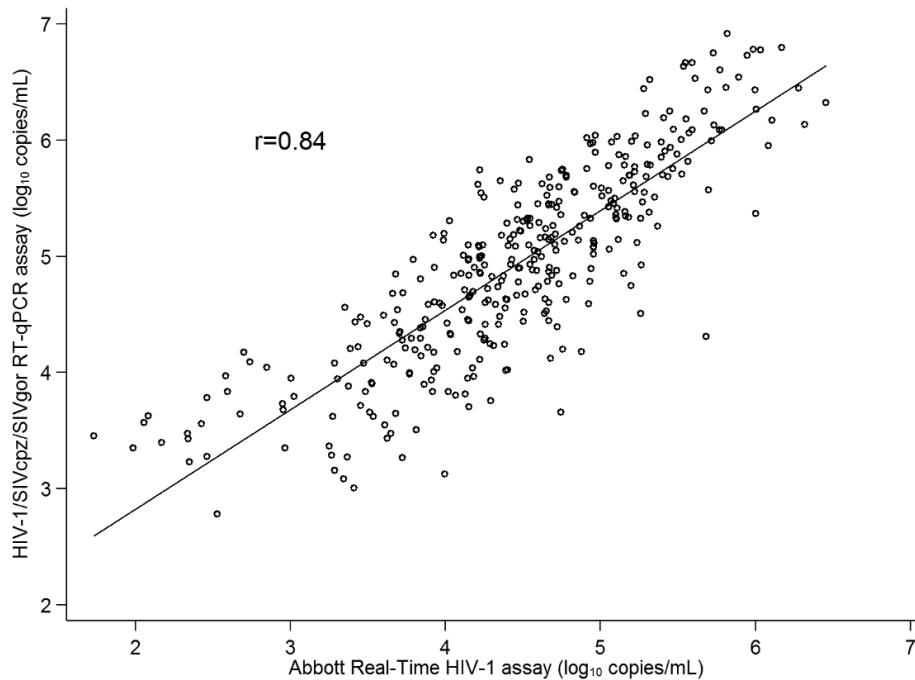


Figure 52. Correlation between the two assays for HIV-1 RNA quantification.

HIV-1 group M RNA viral load quantified by the new universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR and Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, IL, USA). Samples ($n=356$) detected with both assays were plotted on this linearity plot. The solid line represents the Pearson correlation, $r=0.84$; $P < 0.001$.

The Bland-Altman difference plot (**Figure 52**) shows a mean difference of $+0.47$ log₁₀ copies/mL (95% confidence interval (CI); 0.42-0.52) ($r=0.028$ $p=0.60$) corresponding to higher VLs measured with the new assay as compared to Abbott RealTime HIV-1. In total, 16 (4.5%) of the 356 samples that could be quantified in both assays were outside the limits of agreement (average difference ± 1.96 standard deviation of the difference); 10 samples had lower VL and for 6 samples it was the opposite. The samples that were outside the limits of agreement are from diverse HIV-1 variants and represented the general genetic diversity of the study samples; 8 CRF02, 3 from different subtypes, and 3 from other CRFs and 2 not amplified in *pol*, as shown in **Figure 52**.

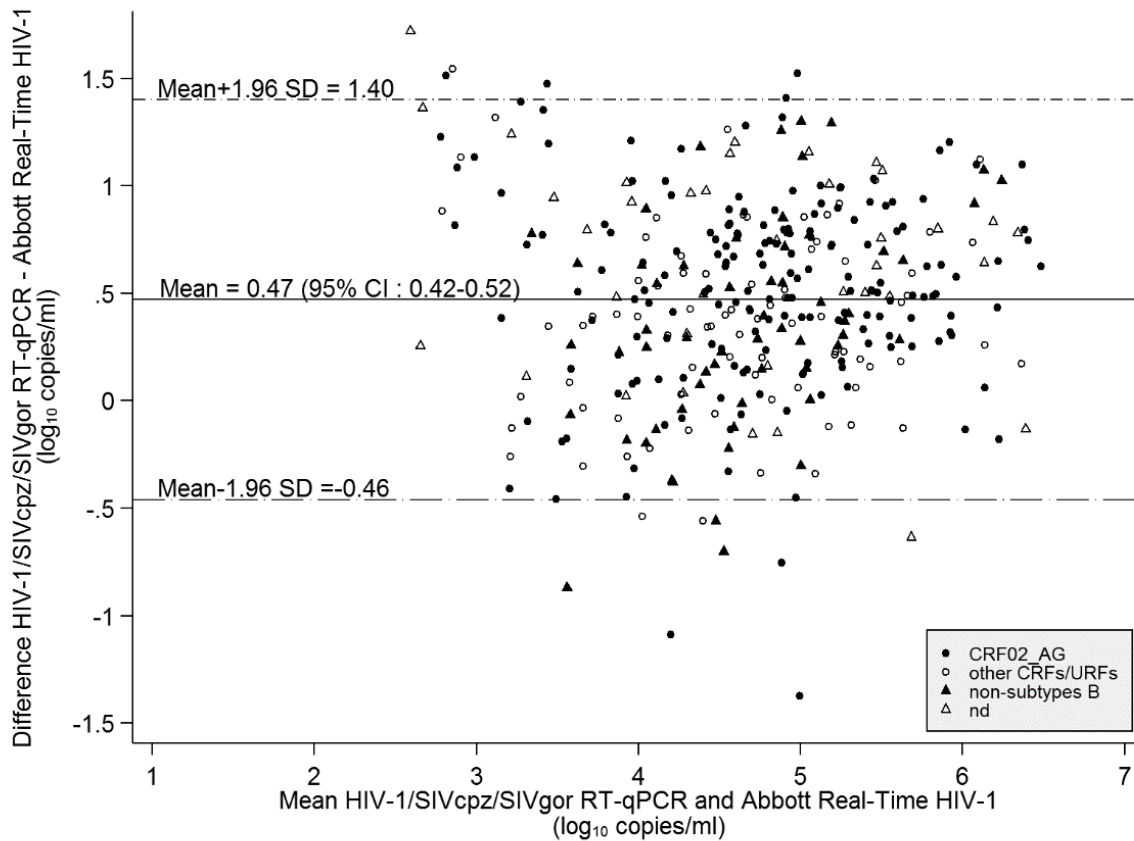


Figure 53. Bland-Altman difference plot comparing the quantifiable HIV-1 RNAi viral loads measured with the two assays among a large diversity of HIV-1 non-B variants (n= 356).

The vertical axis indicates the difference between the universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR and Abbott RealTime HIV-1 assays, and the horizontal axis shows the mean viral load between the two assays. The mean bias on the difference (solid line, + 0.47 log₁₀ copies/mL) and limits of agreement (dashed lines) are shown on the graphic, as well as values of the 95% CI. (nd: genotyping was not done).

3.3.3 Comparison of VL at the threshold of 3.00 log₁₀ copies/mL and implications for patients in resource-limited countries

We also compared the VL of the 474 HIV-1 plasma samples obtained with the two assays at the threshold of 3.00 log₁₀ copies/mL which is recommended by WHO to define virological failure in resource-limited countries (RLCs) (WHO, 2016a). At this threshold, the new assay detected 360 samples versus 339 for the Abbott RealTime HIV-1 assay. Overall, 449/474 (94.7%) VL results above or below this value were concordant; 337 with VL ≥ 3.00 log₁₀ copies/mL and 112 with VL < 3.00 log₁₀ copies/mL in both assays. Among the 337 samples, 303 were previously genotyped and 99% of them had at least one mutation associated with drug resistance (Guichet et al., 2016).

We identified thus 25 discordant samples, 23 of which had VL $>3.00 \log_{10}$ copies/mL with the new assay (VL range; 3.23 to 4.17 copies/mL) but ranged between undetectable to $2.96 \log_{10}$ copies/mL with the Abbott RealTime HIV-1 assay (**Table 7**). The VL differences between the discordant samples ranged between 0.39 to $1.72 \log_{10}$ copies/mL, and were $> 0.5 \log_{10}$ copies/mL or $>1.0 \log_{10}$ copies/mL for 95% and 70% of them, respectively. The two samples below the threshold of $3.00 \log_{10}$ copies/mL with the new assay, are the same as described above. Genotyping was successful for 20 (80%) of 25 discordant samples. Phylogenetic analysis identified a wide diversity of HIV-1 variants and reflect the overall subtype/CRF distribution of the entire study population: CRF02_AG (n=12, 60%), F2 (n=1), G (n=2), CRF09_cpx (n=1), CRF11_cpx (n=1), CRF13_cpx (n=1), CRF22_01A1 (n=1) and CRF37_cpx (n=1).

Among the 20 samples genotyped, 13 strains carried HIV-1 drug resistance mutations (DRMs) conferring resistance to one (n=2), two (n=9) or three (n=2) drugs of the first-line antiretroviral treatment (ART), and in remaining seven samples no drug resistance was predicted and no DRMs identified. Overall, this means that the new VL assay detected 11 additional patients for whom VF was related to drug resistance but failed to detect two patients with DRMs (**Table 6**). On the other hand, the Abbott RealTime HIV-1 assay did not detect 11 patients with DRMs.

Table 7. Discordant VL results between the new universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR and Abbott RealTime HIV-1 assays.

The clinical consequence related to presence of HIV drug resistance mutations (n=25) on the number of the three first-line ART drugs failing (0-3) is shown. The lower detection limit is 1.60 and ~2.70 log₁₀ copies/mL for Abbott RealTime HIV-1 and the universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR, respectively.

Sample ID	Subtype	Abbott RealTime HIV-1 VL log ₁₀ copies/mL	Universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR VL log ₁₀ copies/mL	VL universal - VL Abbott log ₁₀ copies/mL	Number of first-line antiretroviral drugs failing
Y1/286	CRF02_AG	– ^a	3.26	nd	0
C1/147	na	–	3.30	nd	na
C1/1025	na	–	3.38	nd	na
Y1/241	na	1.73	3.45	1.72	na
Y1/208	na	1.99	3.35	1.36	na
Y1/621	CRF02_AG	2.06	3.57	1.51	0
Y1/642	CRF09_cpx	2.08	3.62	1.54	0
Y1/623	CRF02_AG	2.17	3.39	1.23	0
Y1/236	CRF02_AG	2.34	3.42	1.08	1
Y1/629	G	2.34	3.47	1.13	0
Y1/131	CRF11_cpx	2.35	3.23	0.88	2
Y1/613	F2	2.42	3.56	1.13	0
Y1/263	CRF37_cpx	2.46	3.78	1.32	2
Y1/251	CRF02_AG	2.46	3.28	0.81	1
Y1/609	CRF02_AG	2.58	3.97	1.39	2
Y1/651	CRF02_AG	2.60	3.83	1.24	0
Y1/311	na	2.67	3.64	0.96	na
Y1/102	CRF02_AG	2.70	4.17	1.47	2
Y1/066	CRF02_AG	2.74	4.09	1.35	3
Y1/003	CRF02_AG	2.85	4.04	1.20	2
Y1/079	CRF02_AG	2.95	3.68	0.72	2
Y1/183	G	2.95	3.73	0.78	2
Y1/290	CRF02_AG	2.96	3.35	0.39	3
Y1/129	CRF13_cpx	3.67	–	nd	2
Y1/153	CRF22_01A1	4.65	–	nd	2

^a ‘–’ means that HIV VL is not detectable or below lower limit of detection for each assay ; na : not amplified by PCR ; nd : not done

3.4 Discussion

The overall aim of the study was to evaluate the performance of a recently developed open and polyvalent universal HIV-1/SIVcpz/SIVgor RT-qPCR HIV-1 viral load assay in a laboratory setting in sub-Saharan Africa, where many HIV-1 variants co-circulate and to compare results to an FDA-approved assay, Abbott RealTime HIV-1. The tests were performed on 474 plasma samples characterized by a wide range of VL (undetectable to $>7.00 \log_{10}$ copies/mL) and a broad HIV-1 group M genetic diversity predominated by CRF02_AG (56%) in addition to 5 different subtypes (A, D, F, G, H) (18%), 8 different CRFs (18%) and 26 URFs (8%).

Using the lower detection limit of each assay 97.5% concordance was observed between the two assays, and only two samples detected with Abbott RealTime HIV-1 were not identified with the new assay. Repeat testing confirmed that a single sample remained negative with the new assay, this difference could be due to PCR inhibition or a technical error. Important to note is that the other discordant samples had low VL and were below the lower detection limit of the new assay. The different lower detection limits for the two tests are most likely due to different input volumes of plasma used in each assay, 600 μ L for Abbott RealTime HIV-1 versus 140 μ L for the new assay. Despite these different thresholds, the good concordance is most likely due to the fact that VLs are in general higher (mean difference: $+0.47 \log_{10}$ copies/ml) with the new assay.

This difference can be related to the different target regions of the HIV-1 genome between the two tests, which is the long terminal repeat (LTR) for the new assay and integrase for the Abbott RealTime HIV-1 as well as other reagents used. A recent review on VL assays on dried blood spots, reported that VL assays targeting the LTR region seem more sensitive (Parkin 2014) and the Cobas TAqMan HIV-1 test v.2.0 added a LTR target to improve quantification (Sizmann et al., 2010). A positive mean difference ($+0.24 \log_{10}$ copies/mL, $n=112$) was also observed in studies comparing the Generic HIV Viral Load assay (Biocentric) assay, which targets the LTR, to the Abbott RealTime HIV-1 in Gabon (Mouinga-Ondémé et al., 2014). Our previous study showed that our new assay and the Generic HIV Viral Load assay (Biocentric) performed equally on HIV-1 group M variants, $0.02 \log_{10}$ copies/mL difference

only (Etienne et al, 2013). However, the generic HIV-1 viral load test (Biocentric) detects and quantifies only HIV-1 group M in contrast to our assay, which detects all HIV-1 groups and their simian precursors in chimpanzees and gorillas as previously reported (Etienne et al, 2013).

When we used the threshold of 3.00 log copies ml, which defines VF in resource-limited countries, according to WHO guidelines (WHO 2016), the concordance between the two assays values slightly decreased to 94.7 %. The new assay detected 360 samples versus 339 for the Abbott RealTime HIV-1 assay. Among the 25 discordant samples, genotypes and drug resistance patterns were available for 20 with 13 carrying resistance to at least one drug of their first-line ART. From the 13 drug resistant strains, 11 were not detected by Abbott RealTime HIV-1, and two not by the new assay and as a consequence, the corresponding patients would thus not have switched to second-line ART. However, seven non-resistant strains were also detected with the new assay, and the corresponding patients probably need support to improve adherence to their ART. Indeed, as the genotyping is not available in RLCs, the WHO recommends a second VL after at least one month of adherence support to avoid unnecessary switch to second-line (WHO, 2016a). It is thus likely that part of the non-resistant samples will be negative after this intervention (Guichet et al, 2016).

3.5 Conclusions

Routine VL monitoring clearly allows early detection of treatment failure and when it is correctly associated with timely ART switches it will thus limit the emergence of drug resistance, reduce transmission of resistant strains and virological failure in second-line due to high viral load at baseline. Overall, our study showed that the new assay could be easily implemented in a laboratory in RLCs with VL test experience.

Despite absence of divergent HIV-1 group O, N or P samples in our panel and the higher lower detection limit, the new VL assay showed good performance on a wide diversity of HIV-1 group M subtypes and CRFs, as the Abbott RealTime HIV-1 assay. The capacity of the new

assay to detect all HIV-1 groups and their simian ancestors will also allow a timely detection of emerging new HIV-1 variants. However, the new assay can be improved, by using higher input volumes of plasma for a better sensitivity and a lower detection limit, but also by including an internal control to identify technical errors. Nevertheless, scale-up of VL testing and capacity should also be accompanied with improvement of program management to ensure continuous supply of VL tests as well as training and participation in external quality programs.

Chapitre 4.

Comparaison de 3 méthodes d'extraction des acides nucléiques sur DBS en vue de réduire l'impact de l'ADN pro-viral dans la mesure de la charge virale VIH-1 par RT-qPCR et d'adapter le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor à l'utilisation sur DBS.

Résumé

Le prélèvement de sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais) représente une excellente alternative au plasma pour réaliser la charge virale du VIH (CV) dans les zones décentralisées des pays du Sud. Avec les plateformes de CV basées sur la RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), la co-amplification notamment de l'ADN pro-viral augmente la CV DBS, surtout dans les CV plasmatiques $\leq 5\,000$ copies/mL. Ici, nous avons comparé trois méthodes d'extraction des acides nucléiques sur DBS pour réduire l'impact de l'ADN pro-viral, en utilisant le test ouvert et polyvalent universel de CV RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, précédemment décrit dans le **Chapitre 3**. Nous avons sélectionné 151 paires de plasma et de DBS de patients VIH-1 sous traitement antirétroviral au Cameroun ayant préférentiellement des CV plasmatiques $< 10\,000$ copies/mL (75%). Les différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques testées sur DBS étaient les suivantes: (1) extraction couramment utilisée sur les DBS, avec le système automatisé NucliSENS (EasyMAG, BioMérieux) ; (2) extraction manuelle avec le kit Abbott qui extrait préférentiellement l'ARN, d'après le fournisseur ; (3) extraction NucliSENS suivie d'un traitement DNase ; (4) élution des particules virales des DBS avec un tampon phosphate salin (PBS), adaptée du protocole FVE (*free virus elution*, en anglais) qui a été récemment proposé pour le test AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 (Roche), et suivie par l'extraction NucliSENS.

Au seuil d'échec virologique de 1 000 copies/mL, avec les extractions NucliSENS (1) et Abbott (2), il y avait environ 40% de DBS faux-positifs. Etant principalement causés par l'amplification de l'ADN pro-virale dans les faibles CV plasmatiques, leur proportion se réduisait à environ 10 % au seuil de 5 000 copies/mL. Ainsi, les analyses de concordance de Bland-Altman ont montré que l'extraction Abbott sur DBS ne réduit pas l'impact de l'ADN proviral, et qu'elle est comparable à l'extraction NucliSENS ($d = +0,17 \log_{10}$ copies/mL ; $r = -0,19$, $p = 0,08$). En réalisant l'extraction Abbott couplée au test de CV Abbott RealTime HIV-1, nous avons aussi observé des pourcentages de DBS faux-positifs comparables à l'extraction NucliSENS couplée soit au test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, ou soit au test Generic HIV CV. De plus, nous avons observé une proportion importante de DBS faux-négatifs avec les extractions NucliSENS et Abbott. Elle était à la fois liée à la composition du panel, mais aussi à la sous-quantification virale sur DBS (0,6 et 0,4 \log_{10} cp/mL respectivement), comparé aux

CV plasmatiques. Les méthodes PBS (4) et DNase (3) testées diminuaient l'impact de l'ADN pro-viral. Cependant, leur sensibilité respective était mauvaise (59% au seuil de 1 000 copies/mL) voire très mauvaise (20% au seuil de 1 000 copies/mL), probablement à cause d'une élution incomplète de l'ARN et de sa dégradation.

Dernièrement, l'OMS a proposé d'abaisser le seuil de l'échec virologique de 5 000 à 1 000 copies/mL sur DBS, comme pour le plasma. Nos résultats montrent qu'avec les tests de CV par RT-qPCR ouverts et la plupart des tests commerciaux, de nombreux patients pourraient être candidats à une CV de confirmation inappropriée (voire à un changement de traitement pour une 2ème ligne), induisant un surcoût programmatique dans les pays du Sud.

4.1 Introduction

Dans les pays du Sud, l'accès à la charge virale (CV) est un élément clé pour atteindre l'objectif « 90-90-90 » du programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), d'ici à 2020 (UNAIDS, 2013). La 3^{ème} cible de cet ambitieux objectif est que 90% des patients VIH sous traitement antirétroviral (TAR) aient une suppression virale durable. Malgré la recommandation de l'OMS de réaliser un suivi virologique de routine depuis 2013, la couverture générale en test de CV VIH-1 demeure très faible dans les pays du Sud. Actuellement, on estime qu'environ 20% seulement des patients sous TAR ont accès à la CV (1 test/an) dans les pays du Sud (Roberts et al., 2016; WHO, 2013). En Afrique sub-saharienne, c'est surtout en Afrique du Sud que l'accès à la CV s'est développé (WHO, 2013). Si la mise en place des tests de CV continue au rythme actuel, leur couverture restera inférieure à 50% en 2019 d'après les projections de la Clinton Health Access Initiative (UNAIDS, 2013).

En plus des disparités entre les pays, il existe des inégalités d'accès à la CV au sein d'un même pays : entre les villes, où des laboratoires de référence sont équipés de plateformes de CV complexes, et les zones décentralisées où les infrastructures de laboratoire ne permettent pas d'accueillir ces appareils (Boillot et al., 2016; Diouara et al., 2014a; Taieb et al., 2014). En effet, la réalisation de tests de CV complexes sur plasma nécessite à la fois un équipement complexe et coûteux mais aussi une infrastructure de laboratoire adaptée avec du personnel qualifié. Même avec une baisse des prix, ces contraintes liées aux technologies limiteront le passage à l'échelle. L'accès universel rapide à la CV dans toutes les zones démographiques constitue donc un véritable enjeu programmatique pour les pays du Sud.

Dans ce contexte, le prélèvement de sang séché sur papier buvard (DBS, *dried blood spot* en anglais) à la place du plasma est une méthode alternative recommandée par l'OMS pour le suivi virologique des patients en zones décentralisées (Parkin, 2014; Roberts et al., 2016). Les DBS sont relativement faciles à préparer, stocker et transporter. Il suffit de déposer un volume de sang total prélevé par ponction veineuse, souvent 50 µL ou 75 µL, sur des « *spots* » de papier buvard. En l'absence de personnel formé à ce type de prélèvement, on peut aussi faire

directement une piqure au bout du doigt du patient. Le sang total est ensuite recueilli à l'aide d'un tube capillaire afin de déposer le volume souhaité sur les « *spots* » de papier buvard (Maiers et al., 2015; Napierala Mavedzenge et al., 2015; Rutstein et al., 2014). Contrairement au sang total et au plasma, les contraintes liées à la chaîne du froid et au risque biologique sont réduites sur DBS. Une fois séchés, ils peuvent être conservés à température ambiante (+ 30°C) avec des dessiccants jusqu'à 2 semaines, au cours desquelles ils doivent être acheminés vers un laboratoire centralisé disposant de plateformes de CV complexes (Aitken et al., 2015; Monleau et al., 2010). Après ce délai, ils doivent être conservés à -20°C.

La plupart des plateformes de CV classiques sont basées sur la technique de RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) qui amplifie tous les acides nucléiques : ADN et ARN. En utilisant des DBS, on observe souvent des faux-positifs notamment dus à la co-amplification de l'ADN pro-viral et de l'ARN cellulaire du VIH présents dans le sang total. Ce phénomène concerne surtout les échantillons avec des CV plasmatiques faibles ($\leq 5\ 000$ copies/mL) ou indétectables (Monleau et al., 2014; Parkin, 2014). Chez les patients ayant une CV plasmatique indétectable sous TAR, on estime que la quantité d'ADN varie entre 100 et 2 000 copies/ 10^6 cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs). Une étude récente a montré qu'une quantité d'ADN $\geq 1\ 000$ copies/ 10^6 PBMCs chez ces patients est associée à un résultat faux-positif sur DBS (CV DBS $> 1\ 000$ copies/mL), avec le test ouvert Generic HIV CV (Biocentric) (Zida et al., 2016). La plupart des tests de CV par RT-qPCR ont donc une moins bonne spécificité que le test CV basé sur la technique NASBA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0, BioMérieux), qui amplifie uniquement l'ARN (Mercier-Delarue et al., 2014).

Dans les pays du Sud, l'échec virologique est défini par la mesure de deux CV plasmatiques $> 1\ 000$ copies/mL, à intervalle de 3 à 6 mois au cours duquel un renforcement de l'observance est réalisé. Récemment, l'OMS a proposé d'appliquer le seuil de 1 000 copies/mL pour les prélèvements DBS, alors qu'il était de 3 000 ou 5 000 copies/mL auparavant (WHO, 2016a). Avec ce nouveau seuil, il est nécessaire d'adapter certaines plateformes pour lesquelles la spécificité au seuil de 1 000 copies/mL sur DBS est insuffisante (ex. $\leq 60\%$ avec le test Biocentric) (Monleau et al., 2014; WHO, 2014). Avec ce test ouvert, il est possible d'utiliser l'extraction NucliSENS, une des techniques les mieux adaptées pour récupérer tous les acides nucléiques présents sur les DBS (Monleau et al., 2009, 2014; Viljoen et al., 2010).

Certains fournisseurs de tests commerciaux fermés proposent des solutions pour éliminer ou réduire l'impact de l'ADN pro-viral et améliorer la spécificité (> 90%), comme Abbott Molecular (IL, USA) qui déclare que son kit extrait de façon préférentielle l'ARN (Abbott) (Parkin, 2014). De son côté, Roche Molecular System (CA, USA) a récemment proposé le protocole FVE (*free virus elution*, en anglais) pour éluer les particules virales des DBS avec un tampon phosphate salin (PBS), avec le test AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 (Roche) (Wu et al., 2015). Le traitement DNase (DNase) des extraits DBS est également une solution souvent évoquée pour diminuer l'impact de l'ADN pro-viral (Parkin, 2014; Rouet et al., 2014; Viljoen et al., 2010). Aucune de ces 3 méthodes d'extraction (Abbott, PBS et DNase) n'a encore été testée sur un large panel d'échantillons incluant en particulier des faibles CV plasmatiques et indétectables, où l'impact de l'ADN pro-viral est pourtant le plus important.

Récemment, un test ouvert et polyvalent universel de CV par RT-qPCR a été développé au laboratoire (RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor) (Etienne et al., 2013). Il possède la particularité de détecter et de quantifier tous les variants connus de la lignée VIH-1, ainsi que les SIVs de chimpanzés (SIVcpz) et de gorilles (SIVgor) à l'origine des 4 transmissions inter-espèces de VIH-1 M, N, O et P. La quantification des variants du VIH-1 avec ce nouveau test ouvert est comparable au test Generic HIV Charge Virale (Biocentric). Comme nous venons de le montrer, il a aussi une meilleure sensibilité au seuil de 1 000 copies/mL par rapport au test Abbott RealTime HIV-1 (IL, USA) (**Chapitre 3, travaux de thèse**). L'utilisation de ce test a donc été validée sur plasma mais il reste à étudier comment il peut être adapté à une application optimale à grande échelle sur DBS.

4.2 Objectifs

L'objectif était de comparer trois méthodes d'extraction en vue de réduire la quantité d'ADN pro-viral des DBS, par rapport à l'extraction NucliSENS, afin d'adapter le test ouvert RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor à l'utilisation sur DBS.

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Collecte, préparation et sélection des paires de plasma et de DBS

Les DBS ont été préparés de Mai à Juillet 2014 au laboratoire de virologie du Centre de Recherche sur les Maladies Emergentes et Ré-émergentes (CREMER) de Yaoundé (Cameroun), à partir de prélèvements de sang total réceptionnés dans les 6h suivant leur collecte sur des tubes EDTA. Ils provenaient de patients bénéficiant d'un suivi virologique, après plus de 6 mois de TAR. Après ré-homogénéisation du prélèvement, 5 spots de 50 μ L de sang total ont été préparés sur une carte de papier buvard Whatman Protein-Saver 903 (GE-Healthcare, PA, USA), et séchés toute la nuit à température ambiante (20-28°C). Chaque carte a ensuite été placée individuellement dans un sachet plastique zippé contenant 2 dessiccants et stockée à -80°C, en vue d'analyser la CV DBS avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor.

Parallèlement, le restant de sang total a été centrifugé afin de préparer les aliquots de plasma, conservés à -80°C, en vue de réaliser la CV plasmatique avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor. En fonction des résultats obtenus, nous avons préférentiellement sélectionné des paires de plasma et de DBS ayant des CV plasmatiques < 1 000 et comprises entre 1 000 - 10 000 copies/mL, qui sont les catégories pour lesquelles l'impact de l'ADN pro-viral est le plus important. Deux cartes DBS minimum par patient ont été préparées, dont une directement utilisée pour tester l'extraction Abbott au laboratoire du CREMER. L'autre carte a été envoyée au laboratoire de virologie UMI233 TransVIHMI de Montpellier (France) pour réaliser le protocole d'extraction couramment utilisé sur DBS (NucliSENS) et tester les méthodes de traitement DNase et d'élution PBS.

4.3.2 Extraction des acides nucléiques et détermination de la charge virale plasmatique

Les acides nucléiques du VIH-1 ont été extraits à partir de 140 μ L de plasma avec le minikit QIAamp viral RNA (Qiagen, Courtaboeuf, France), sur l'automate Qiacube (Qiagen, Courtaboeuf, France), en suivant le protocole du fournisseur. Ils ont été élués dans 60 μ L. Les standards et les contrôles du kit Generic HIV Charge Virale (Biocentric, Bandol, France) ont été utilisés et extraits en suivant le même protocole que les échantillons. La quantification de

l'ARN du VIH a ensuite été réalisée avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, dans les conditions précédemment décrites dans cette thèse (**Chapitre 1**, synthèse bibliographique : **partie 3.2.2.2** et **Chapitre 3 travaux de thèse**), ainsi que dans la littérature (Etienne et al., 2013). On estime que la limite de détection inférieure (LDI) est d'environ 500 copies/mL sur plasma. Le test ouvert commercialisé Generic HIV Charge Virale (Biocentric) a été réalisé en parallèle, à partir des mêmes extraits, en suivant le protocole du fournisseur (Rouet et al., 2007). Les résultats sont brièvement présentés dans la partie **Analyses complémentaires**, à la fin de ce chapitre.

4.3.3 Extraction des acides nucléiques et détermination de la charge virale DBS

La CV DBS a été mesurée avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, comme pour le plasma. En parallèle, la CV DBS a été réalisée avec le test Generic HIV Charge Virale (Biocentric), à partir des mêmes extraits, en suivant le protocole du fournisseur (Viljoen et al., 2010). La CV DBS a aussi été mesurée parallèlement avec le test commercial Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, IL, USA) sur les DBS extraits selon la méthode recommandée par le fournisseur. Concernant l'extraction des DBS, le kit Qiagen n'a pas été utilisé en raison de ses faibles performances à isoler l'ARN du VIH-1 à partir des DBS. Il a été remplacé par l'extraction NucliSENS, qui fait partie des techniques les mieux adaptées pour récupérer les acides nucléiques présents sur les DBS (Monleau et al., 2009). Dans cette étude, les acides nucléiques ont été extraits à partir d'un volume total de 100 µL de sang total (deux spots de 50 µL), avec les 4 protocoles suivants :

(1) **Extraction NucliSENS (EasyMAG, BioMérieux, Craponne, France)**. Deux spots de DBS ont été découpés et incubés sous agitation pendant 60 min, à température ambiante, dans 2 mL de tampon de lyse NucliSENS (BioMérieux, Craponne, France), dans des tubes coniques de 15 mL. Ensuite, les particules de papier ont été éliminées du surnageant par deux centrifugations de 2 min à 3 500 rpm, et le transfert intermédiaire du surnageant dans un nouveau tube. Les acides nucléiques ont été extraits à partir du lysat total (environ 2 mL), en suivant le protocole « Generic » du système d'extraction automatisé NucliSENS (EasyMAG), et élués dans 60 µL.

(2) Extraction Abbott (mSample Preparation System RNA, IL, USA), correspondant au kit d'extraction utilisé pour réaliser le test de CV Abbott RealTime HIV-1. Deux spots de DBS ont été découpés et incubés sous agitation pendant 20 min, à température ambiante, dans 1,7 mL de tampon mLysis (Abbott Molecular, IL, USA) dans des tubes coniques de 50 mL. Les acides nucléiques ont été extraits à partir d'1 mL de lysat, en suivant le protocole d'extraction manuelle HIV-1 RNA 1.0 mL, qui utilise un contrôle interne. A partir des 88 µL d'extraits obtenus, une CV Abbott RealTime HIV-1 a été mesurée en utilisant le protocole m2000 DBS HIV-1 RNA « open-mode », afin de servir de contrôle qualitatif pour confirmer la réalisation correcte l'extraction manuelle. En cas de résultat invalidé, une nouvelle extraction manuelle était réalisée.

(3) Extraction NucliSENS suivie du traitement DNase (Turbo DNase-free, Ambion by life Technologies, CA, USA). Trente microlitres d'extraits d'acides nucléiques du protocole (1) ont été mélangés « doucement » avec 3 µL de tampon Turbo DNase et 1 µL d'enzyme Turbo DNase (2U/µL), puis incubés pendant 20 min à 37°C dans des tubes de 0,5 mL. Ensuite, 3 µL de DNase Inactivation Reagent ont été ajoutés et incubés 5 min à température ambiante, en mixant le mélange dès le départ, puis 2 à 3 fois pendant l'incubation. Après une centrifugation de 5 min à 10 000 rpm, un culot blanc visible d'agent inactivant était observé. Le surnageant contenant l'ARN était alors prélevé minutieusement (20 µL, sans toucher le culot) et transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL.

(4) Elution des particules virales dans du tampon phosphate salin (PBS) suivie d'une extraction NucliSENS. Cette approche est adaptée d'après le protocole FVE (*free virus elution*, en anglais), récemment proposé pour le test AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 sur DBS (Roche Molecular System, CA, USA) (Wu et al. 2015). Deux spots de DBS ont été découpés et déposés individuellement dans un puits (plaque de 24 puits) contenant 500 µL de tampon phosphate salin (PBS) sans calcium et sans magnésium (Gibco ; 155 mM NaCl ; 3,0 Na₂HPO₄-7H₂O ; 1,1 mM KH₂PO₄ ; pH 7,4). Ils ont été incubés toute une nuit à température ambiante, sans agitation. Les acides nucléiques ont ensuite été extraits à partir du surnageant (éluat DBS) repris dans 2 mL de tampon de lyse NucliSENS, en suivant le protocole d'extraction NucliSENS (EasyMAG) décrit ci-dessus, et ils ont élués dans 60 µL. Comme dans le protocole FVE, la valeur mesurée sur DBS a été corrigée par un facteur de 2 (+ 0,3 log₁₀ copies/mL), prenant en compte le fait que la fraction de plasma éluee corresponde à la moitié du volume de sang total initial.

En parallèle, pour vérifier la quantité d'acides nucléiques restant sur les DBS, les spots ont été re-suspendus dans 2 mL de tampon de lyse NucliSENS et de nouveau incubés sous agitation pendant 60 min, à température ambiante, en utilisant des tubes coniques de 15 mL. Après une centrifugation de 2 min à 3 500 rpm, le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube qui a été conservé à -80°C, en vue d'analyser la CV RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor sur certains de ces spots résiduels de DBS.

4.3.4 Analyses statistiques

Les CV plasmatiques du test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor constituent les valeurs de références. Le nombre de faux-résultats de CV DBS, la sensibilité, la spécificité et l'exactitude ont été calculés pour différents seuils. Le nombre de faux-positifs au seuil de 1 000 copies/mL correspond au nombre de CV DBS $\geq 1\ 000$ copies/mL parmi le nombre total de CV plasmatiques $< 1\ 000$ copies/mL. Le nombre de faux-négatifs au seuil DBS de 1 000 copies/mL correspond au nombre de CV DBS $< 1\ 000$ copies/mL parmi le nombre total de CV plasmatiques $\geq 1\ 000$ copies/mL. La spécificité (Sp) au seuil de 1 000 copies/mL correspond au nombre de CV DBS $< 1\ 000$ copies/mL parmi le nombre total de CV plasmatiques $< 1\ 000$ copies/mL. La sensibilité au seuil de 1 000 copies/mL correspond au nombre de CV DBS $\geq 1\ 000$ copies/mL parmi le nombre total de CV plasmatiques $\geq 1\ 000$ copies/mL. De la même manière, le nombre de faux-positifs et de faux-négatifs, Sp et Se au seuil de 5 000 copies/mL ont été calculés. Enfin l'exactitude correspond à la somme des vrais-résultats de CV DBS mesurées pour chacun des seuils, parmi le nombre total d'échantillons.

Les comparaisons entre les CV DBS et CV plasmatiques (ou entre deux protocoles d'extraction) ont été réalisées sur des paires d'échantillons quantifiables. Pour mesurer l'intensité des relations linéaires, les coefficients de corrélation de Pearson (r) ont été calculés. Pour mesurer la concordance, les analyses graphiques de Bland-Altman ont été réalisées (Bland et Altman, 1999). L'association entre la différence et la moyenne de CV était mesurée avec un coefficient de corrélation et un test de significativité de la corrélation. Un *t* test a été réalisé pour déterminer si la différence moyenne (d) était significativement différente de zéro. Les limites de concordances étaient égales à $d \pm 1,96$ ET (écart-type).

4.4 Résultats

4.4.1 Sélection des paires de plasma et DBS

Sur un total de 536 DBS préparés, nous avons sélectionné 151 paires de plasma et de DBS, dont la majorité avait des CV plasmatiques $\leq 10\ 000$ copies/mL. Leur répartition par catégorie de CV plasmatique était la suivante : 68 (45%) avec CV $< 1\ 000$ copies/mL, 30 (20%) avec CV $\geq 1\ 000 - 5\ 000$ copies/mL, 13 (9%) avec CV $> 5\ 000 - 10\ 000$ copies/mL et 40 (26%) $> 10\ 000$ copies/mL (dont 15 compris entre $10\ 000 - 20\ 000$ copies/mL).

4.4.2 Analyse des résultats au seuil de 1 000 copies/mL, avec les différentes méthodes d'extractions des DBS

La spécificité au seuil de 1 000 copies/mL était plus élevée avec le traitement DNase (100%) et l'élution PBS (82%) qu'avec les extractions NucliSENS et Abbott (60% environ) (**Tableau 8**). Cependant, les extractions DNase et PBS ont montré une sensibilité insuffisante et celles d'Abbott et NucliSENS avaient une meilleure sensibilité ($\geq 80\%$, au seuil de 1 000 copies/mL). Dans le détail, la sensibilité des extractions Abbott et NucliSENS variait respectivement entre : 70% (IC 95% 54-86) et 57 % (IC 95% 39-75) dans les CV plasmatiques faibles (1 000 - 5 000 copies/mL), et plus de 90% dans les CV plasmatiques $> 10\ 000$ copies/mL. La sensibilité de l'élution PBS était plus faible (59% ; IC 95% 48-70) mais elle atteignait tout de même 80% (IC 95% 68-92) dans les CV plasmatiques $> 10\ 000$ copies/mL. Celle du traitement DNase était très mauvaise (21% ; IC 95% 11-29) même dans les CV plasmatiques $> 10\ 000$ copies/mL où elle était égale à 33% (IC 95% 18-48).

Dans cette étude, l'exactitude des résultats au seuil d'échec virologique de 1 000 copies/mL était d'environ 70% seulement avec les extractions NucliSENS, Abbott et l'élution PBS, et de 56% avec la méthode DNase (**Tableau 8**). Comme la proportion de faux-résultats était importante, nous les avons analysés plus en détails, en fonction de chaque méthode d'extraction :

(1) Avec l'extraction NucliSENS, il y a eu 27/68 (40%) DBS faux-positifs, dont 24 CV DBS $> 1\ 000$ copies/mL [CV DBS médiane = 2 024 copies/mL (IQR = 1 394 - 3 888), CV DBS min-max = 1 007 - 6929 copies/mL] alors que la CV plasmatique était non quantifiable (< 500 copies/mL). Les 3 autres échantillons avaient des CV plasmatiques comprises entre 500

- 1 000 copies/mL et des CV DBS > 1 000 copies/mL (1 868, 3 998 et 8 767 copies/mL), avec une différence de valeurs entre les paires de plasma et de DBS > 0,5 log₁₀ copies/mL pour les deux derniers échantillons.

De plus, eu 14/83 (17%) DBS faux-négatifs. Dans le détail, il y avait 9 CV plasma > 1 000 copies/mL (CV plasmatique médiane = 5 209 copies/mL, IQR = 3 086 - 11 822) qui sont passées en dessous du seuil de 1 000 copies/mL sur DBS, avec une différence de valeurs entre les paires de plasma et de DBS > 0,5 log₁₀ copies/mL pour 8 échantillons. Les 5 échantillons restants avaient des CV DBS non quantifiables (< 500 copies/mL) et une CV plasmatique médiane égale à 3 103 copies/mL (IQR = 1 540 - 3 141).

Sur l'ensemble des paires de plasma et de DBS quantifiables (n=82), les différences de CV étaient les suivantes: > 0,5 log₁₀ copies/mL pour 49% et > 1,0 log₁₀ copies/mL pour 13%.

(2) Avec l'extraction Abbott, il y eu 28/68 (41%) DBS faux-positifs, dont 25 CV DBS > 1 000 copies/mL [CV DBS médiane = 3 535 copies/mL (IQR 2 198 - 5 033), CV DBS min-max = 1 383 - 7 819 copies/mL] alors que la CV plasmatique était non quantifiable (< 500 copies/mL). Les 3 autres échantillons avaient des CV plasmatiques comprises entre 500 - 1 000 copies/mL et des CV DBS > 1 000 copies/mL (1 631, 3 526 et 7 795 copies/mL), avec une différence de valeurs entre les paires de plasma et de DBS > 0,5 log₁₀ copies/mL pour les deux derniers échantillons. Ils correspondent aux 3 mêmes échantillons déjà décrits avec NucliSENS.

Nous avons aussi obtenu 17/83 (20%) DBS faux-négatifs, qui avaient tous des CV DBS non quantifiables et une CV plasmatique médiane égale à 3 102 copies/mL (IQR 1 415 – 4 597). Sur l'ensemble des paires de plasma et de DBS quantifiables (n=69), les différences de CV étaient les suivantes: > 0,5 log₁₀ copies/mL pour 36% et > 1,0 log₁₀ copies/mL pour 7%.

(3) Avec le traitement DNase, il y avait aucun DBS faux-positif et 80% (66/83) de DBS faux-négatifs. Les rares patients (n=17) dont l'échec virologique était correctement diagnostiqué sur DBS avaient généralement des CV plasmatiques > 10 000 copies/mL (76% des cas). Les valeurs mesurées sur DBS étaient significativement très inférieures au plasma, et les différences suivantes ont été mesurées sur les 29 paires de plasma et de DBS quantifiables: > 0,5 log₁₀ copies/mL pour 86%, > 1,0 log₁₀ copies/mL pour 66%, et > 2,0 log₁₀ copies/mL pour 21%.

(4) Avec l'élution PBS, on a observé 18% (12/68) de DBS faux-positifs et 40% (33/82) de DBS faux-négatifs. Les patients en échec virologique correctement diagnostiqués sur DBS (n=48) avaient souvent des CV plasma > 10 000 copies/mL (65% des cas). Sur l'ensemble des paires de plasma et DBS quantifiables (n=54), les différences de CV étaient les suivantes : > 0,5 log₁₀ copies/mL pour 56%, et > 1,0 log₁₀ copies/mL pour 28%.

Afin de vérifier la quantité d'acides nucléiques restée sur le papier buvard, nous avons mesuré la CV de 18 spots résiduels (après l'étape d'élution PBS), ayant des CV plasmatiques > 10 000 copies/mL. Sur DBS, la CV médiane était égale à 4,66 log₁₀ copies/mL (IQR 4,28-5,04), et 89% (16) d'entre eux avaient une différence de CV > 0,5 log₁₀ copies/mL, comparée au plasma. Sur les spots résiduels, des valeurs élevées ont également été mesurées (CV médiane = 4,07 log₁₀ copies/mL ; IQR 3,82-4,48). Finalement, 61% (11/18) des spots résiduels testés avaient une CV comparable à la valeur mesurée sur DBS, avec une différence de CV < 0,5 log₁₀ copies/mL. Comme l'impact de l'ADN pro-viral est négligeable dans les CV élevées, il est probable que les CV mesurées sur les spots résiduels correspondent, en grande partie, à l'amplification de particules virales non éluées.

4.4.3 Analyse des résultats DBS au seuil de 5 000 copies/mL

Comme le seuil de 1 000 copies/mL donnait des pourcentages élevés de DBS faux-positifs avec NucliSENS et Abbott, pour des échantillons qui avaient généralement une CV plasmatique < 5 000 copies/mL, nous avons comparé les performances des méthodes d'extraction au seuil d'échec virologique de 5 000 copies/mL (**Tableau 8**). On a ainsi observé que ces nouveaux pourcentages ont été divisés par trois, avec respectivement 8% (8/98) et 12% (12/98) pour les extractions NucliSENS et Abbott. Le nombre de faux-négatifs augmentait avec respectivement 42% (22/53) et 34% (18/53). Avec les méthodes DNase et PBS, il y avait ≤ 1% de faux-positif. On a observé 51% (27/53) DBS faux-négatifs avec l'élution PBS. Le traitement DNase restait insuffisamment sensible pour diagnostiquer l'échec virologique, avec 79% (42/53) de faux-négatifs. Au final, l'exactitude des résultats au seuil d'échec virologique de 5 000 copies/mL était d'environ 80% seulement avec les extractions NucliSENS, Abbott et l'élution PBS, et d'environ 70% avec le traitement DNase.

Tableau 8. Sensibilité, spécificité et exactitude pour détecter l'échec virologique avec les différentes stratégies d'extractions sur DBS couplées au test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, aux seuils de 1 000 et 5 000 copies/mL.

Paires de plasma et DBS (n=151)	Nb (%) de paires avec CV plasmatique $\geq 1\ 000 = 83$ (55%)					Nb (%) de paires avec CV plasmatique $\geq 5\ 000 = 53$ (35%)					Paires quantifiables $\geq 1\ 000$ copies/mL		
	Nb de faux-positifs ^a / nb total de paires avec CV plasmatique < 1 000	Nb de faux-négatifs ^b / nb total de paires avec CV plasmatique $\geq 1\ 000$	Sp (% [IC 95%])	Se (% [IC 95%])	Exactitude (% [IC 95%])	Nb de faux-positifs ^c / nb total de paires avec CV plasmatique < 5 000	Nb de faux-négatifs ^d / nb total de paires avec CV plasmatique $\geq 5\ 000$	Sp (% [IC 95%])	Se (% [IC 95%])	Exactitude (% [IC 95%])	n	Différence de CV > 0,5 log ₁₀ copies/mL	Différence de CV > 1,0 log ₁₀ copies/mL
(1) NucliSENS	27/68 (40%)	14/83 (17%)	60 (48-72)	83 (75-91)	73 (66-80)	8/98 (8%)	22/53 (42%)	92 (87-97)	58 (45-71)	80 (74-86)	82	40 (49%)	11 (13%)
(2) Abbott	28/68 (41%)	17/83 (20%)	59 (47-71)	80 (71-88)	70 (63-77)	11/98 (12%)	18/53 (34%)	88 (82-94)	66 (53-79)	80 (74-86)	69	25 (36%)	5 (7%)
(3) Dnase	0/68 (0%)	66/83 (80%)	100 (100-100)	21 (11-29)	56 (48-64)	0/98 (0%)	42/53 (79%)	100 (100-100)	21 (10-32)	72 (65-79)	29	25 (86%)	19 (66%)
(4) PBS	12/68 (18%)	33/82* (40%)	82 (73-91)	60 (49-70)	70 (63-77)	1/97* (1%)	27/53 (51%)	99 (97-100)	49 (36-63)	81 (75-83)	54	30 (56%)	15 (28%)

^aFaux-positifs sont les échantillons avec CV < 1 000 copies/mL sur plasma mais $\geq 1\ 000$ copies/mL sur DBS. ^bFaux-négatifs sont les échantillons avec CV $\geq 1\ 000$ copies/mL sur plasma mais < 1 000 copies/mL sur DBS. ^cFaux-positifs sont les échantillons avec CV < 5 000 copies/mL sur plasma mais $\geq 5\ 000$ copies/mL sur DBS. ^dFaux-négatifs sont les échantillons avec CV $\geq 5\ 000$ copies/mL sur plasma mais < 5 000 copies/mL sur DBS. Sp : spécificité. Se : sensibilité. IC : intervalle de confiance. *1 échantillon épuisé (CV_{EV946} = 4 597 copies/mL).

4.4.4 Comparaison des extractions Abbott et NucliSENS sur DBS

Alors que l'extraction Abbott représentait une solution alternative pour l'extraction des acides nucléiques sur DBS, l'analyse des résultats au seuil de 1 000 copies/mL et 5 000 copies/ml a montré que les performances des extractions Abbott et NucliSENS sont similaires, suggérant que l'extraction avec le kit Abbott ne réduirait pas l'impact de l'ADN proviral, par rapport à l'extraction NucliSENS. Ici, nous avons comparé plus en détails ces deux extractions.

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs de CV DBS par rapport aux CV plasmatiques, à partir du nombre total de paires quantifiables avec les extractions NucliSENS (n= 82) et Abbott (n= 69). On a observé une bonne corrélation linéaire avec un coefficient de Pearson respectivement égal à 0,81 ($p < 0,001$) et 0,86 ($p < 0,001$). Par contre, l'analyse de Bland-Altman a montré qu'il y avait une mauvaise concordance entre les deux mesures, avec une augmentation significative des valeurs de CV DBS dans les faibles CV plasmatiques ($< 5\ 000$ copies/mL), avec les extractions NucliSENS (**Figure 40, a**) et Abbott (**Figure 40, c**). Pour cette raison, la différence moyenne entre les valeurs de CV DBS et CV plasma n'était pas mesurable.

En sélectionnant les CV plasmatiques $\geq 5\ 000$ copies/mL, nous avons 53 et 49 paires de plasma et de DBS quantifiables avec respectivement les extractions NucliSENS et Abbott. La corrélation restait toujours bonne entre les deux méthodes, avec les coefficients de Pearson respectifs 0.86 ($p < 0,001$) et 0.87 ($p < 0,001$). L'analyse de Bland-Altman a montré qu'il y avait désormais une bonne concordance, sans différence significative entre les mesures dans les faibles CV, avec les extractions NucliSENS ($r= 0,01$; $p= 0,94$) (**Figure 40, b**) et Abbott ($r= -0,21$; $p= 0,14$) (**Figure 40, d**). Ainsi, on a pu estimer la sous-quantification mesurée sur DBS, par rapport au plasma : -0.64 [IC 95% (-0.77 ; -0.50), $p < 0,001$] et -0.43 [IC 95% (-0.56 ; -0.30), $p < 0,001$] \log_{10} copies/mL, avec respectivement les extractions NucliSENS et Abbott. Il y avait peu d'échantillons en dehors des limites inférieures et supérieures de concordance, respectivement 3/53 (6%) et 4/49 (8%), dont 2 échantillons identiques aux deux extractions. La proportion d'échantillons ayant une différence de CV $> 0,5 \log_{10}$ copies/mL demeurait importante : 58% (31/53) des DBS extraits avec NucliSENS et 45% (22/49) des DBS extraits avec Abbott.

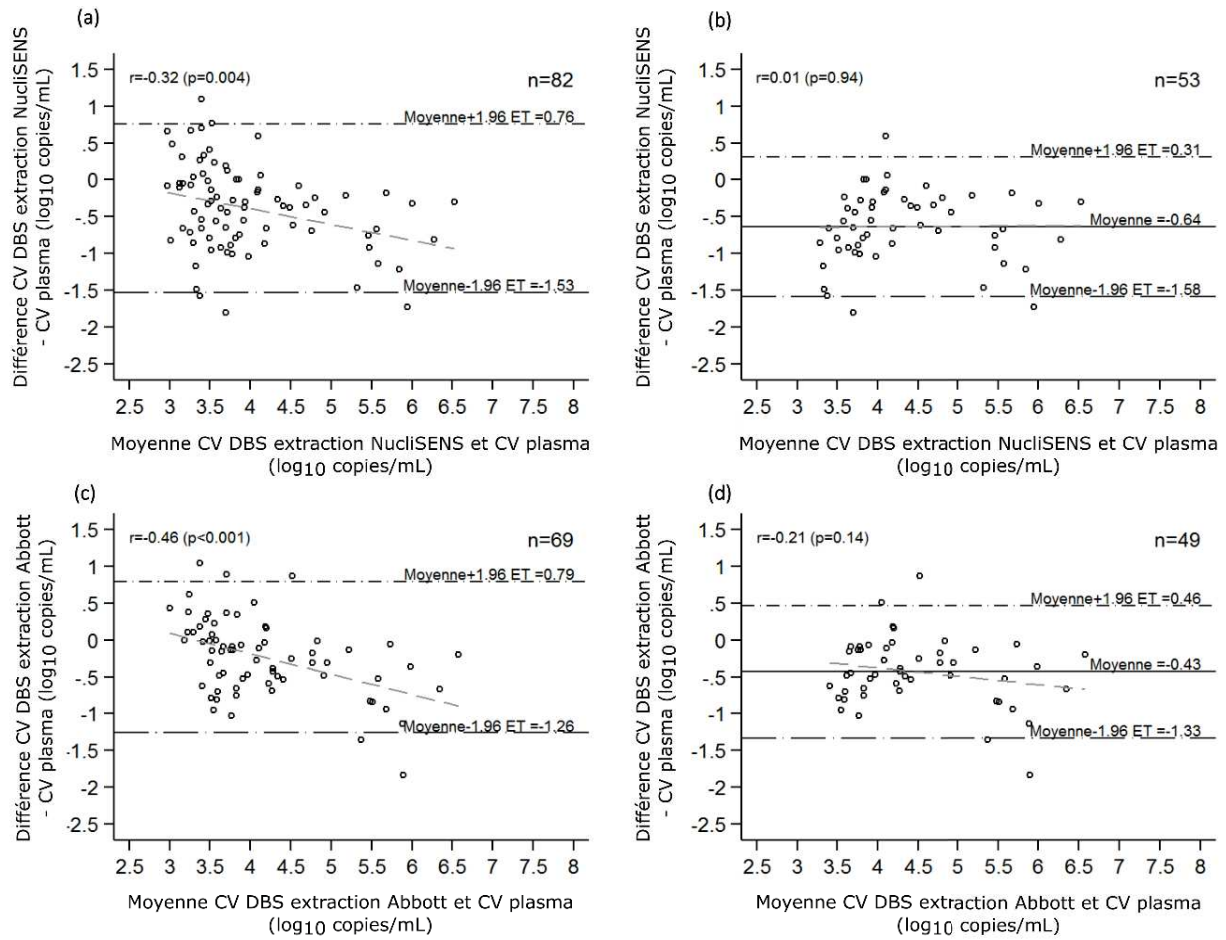
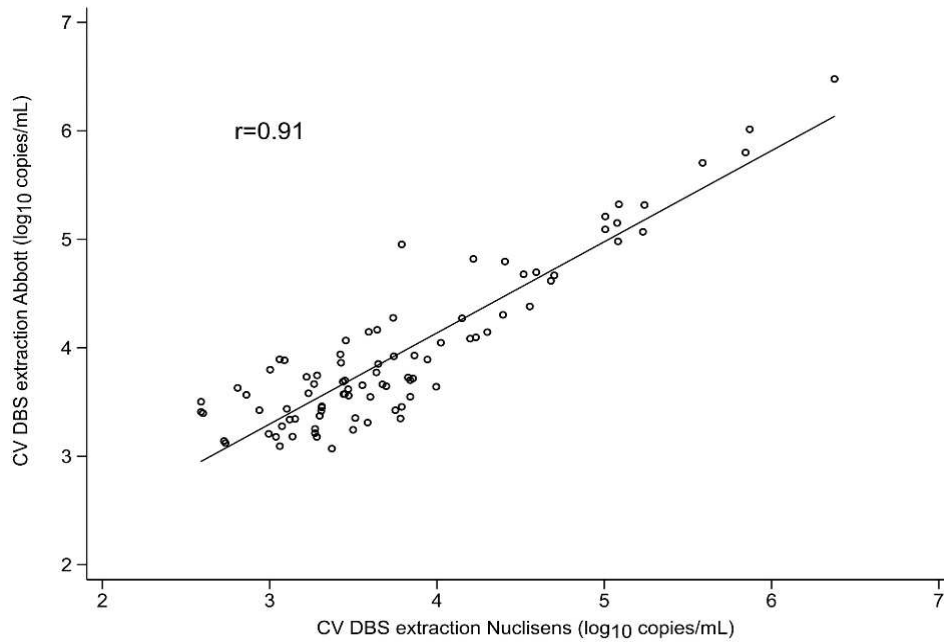


Figure 54. Analyse de la concordance par Bland-Altman, entre les CV DBS par rapport aux CV plasmatiques mesurées avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor.

Sélection de toutes les paires quantifiables avec NucliSENS (a) et Abbott (c). Sélection des paires de CV plasmatique $\geq 5\,000$ copies/mL avec NucliSENS (b) et Abbott (d) : la sous-quantification mesurée sur DBS, par rapport au plasma est respectivement égale à -0.64 [IC 95% (-0.77 ; -0.50), $p < 0,001$] et -0.43 [IC 95% (-0.56 ; -0.30), $p < 0,001$] \log_{10} copies/mL. L'axe x des abscisses représente la moyenne des valeurs mesurées avec les deux extractions. L'axe y des ordonnées représente la différence de valeurs mesurées entre les deux extractions pour chaque paire de DBS. La ligne en trait plein représente la différence moyenne (biais) (d) et les lignes en pointillées représentent deux limites de concordance ($d \pm 1.96$ ET).

En dernier lieu, nous avons comparé l'extraction Abbott par rapport à NucliSENS sur 88 paires de DBS Abbott et de DBS NucliSENS quantifiables. Nous avons obtenu une très bonne corrélation entre les deux extractions ($r = 0,91$; $p < 0,001$) (Figure 41, a). L'analyse de Bland-Altman a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les CV faibles et élevées ($r = -0,19$; $p = 0,08$), entre les deux extractions (Figure 41, b). L'extraction Abbott avait des valeurs supérieures de $0,17 \log_{10}$ copies/mL ($p < 0,001$) par rapport à l'extraction NucliSENS, et seulement 4/88 (4,5%) échantillons étaient à l'extérieur de la limite supérieure de concordance. Enfin, 18% (16/88) des échantillons avaient une différence de CV $> 0,5 \log_{10}$ copies/mL entre les deux valeurs.

(a)



(b)

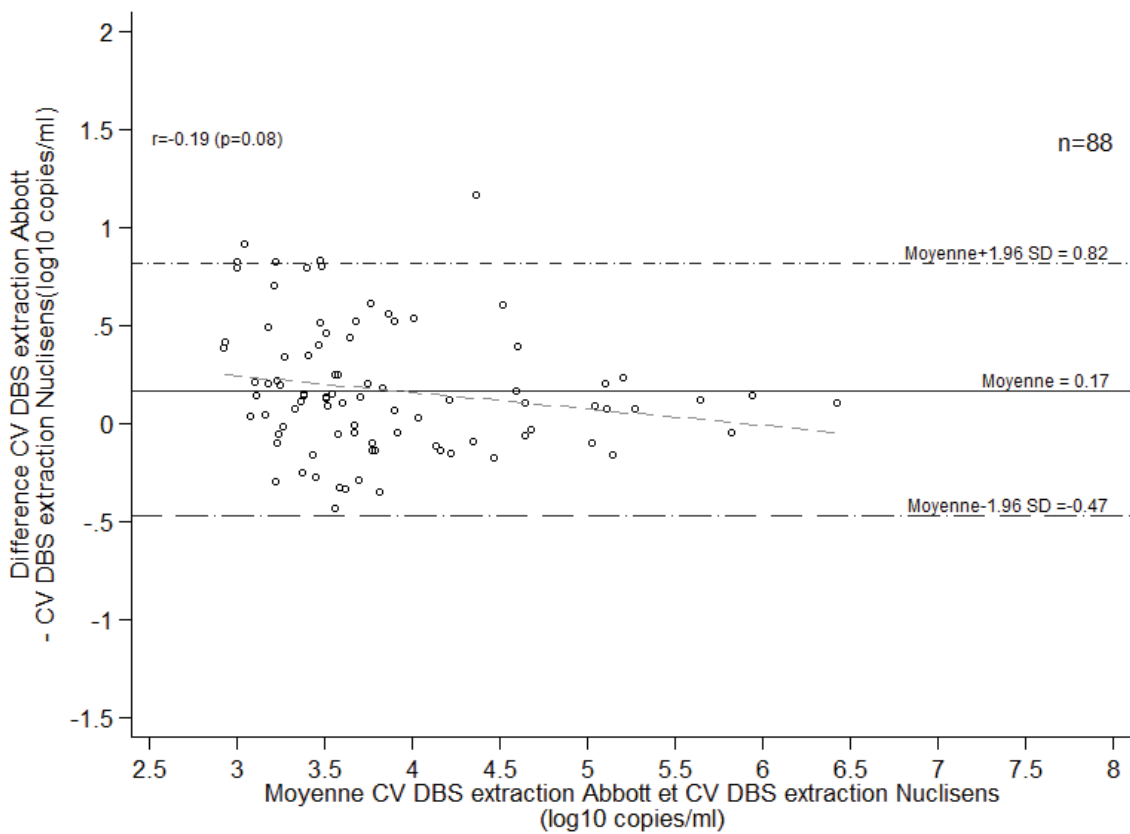


Figure 55. Comparaison entre les extractions Abbott et NuclisENS, sur les paires de DBS quantifiées avec le test de CV VIH-1/SIVcpz/SIVgor (n=88).

(a) Analyse de la corrélation, r : coefficient de Pearson. (b) Analyses de concordance de Bland-Altman.

Tableau 9. Sensibilité, spécificité et exactitude pour détecter l'échec virologique avec les différents kits de CV, aux seuils de 1 000 et 5 000 copies/mL.

Paires de plasma et DBS (n=151)	Nb (%) de paires avec CV plasmatique $\geq 1\ 000 = 83$ (55%)					Nb (%) de paires avec CV plasmatique $\geq 5\ 000 = 53$ (35%)					Paires quantifiables	
Méthode d'extraction - test de CV RT-qPCR sur DBS	Nb de faux-positifs ^a / nb total de paires avec CV plasmatique < 1 000	Nb de faux-négatifs ^b / nb total de paires avec CV plasmatique $\geq 1\ 000$	Sp (% [IC 95%])	Se (% [IC 95%])	Exactitude (% [IC 95%])	Nb de faux-positifs ^c / nb total de paires avec CV plasmatique < 5 000	Nb de faux-négatifs ^d / nb total de paires avec CV plasmatique $\geq 5\ 000$	Sp (% [IC 95%])	Se (% [IC 95%])	Exactitude (% [IC 95%])	n	Différence de CV > 0,5 log ₁₀ copies/mL
NucliSENS - VIH-1 /SIVgor/SIVcpz	27/68 (40%)	14/83 (17%)	60 (48-72)	83 (75-91)	73 (66-80)	8/98 (8%)	22/53 (42%)	92 (87-97)	58 (45-71)	80 (74-86)	82	40 (49%)
Abbott – Abbott RealTime HIV-1 (Abbott)	28/67* (42%)	14/82* (17%)	58 (46-70)	83 (75-91)	72 (65-79)	11/96** (11%)	13/53 (25%)	89 (83-95)	75 (63-87)	88 (83-93)	72	17 (24%)
NucliSENS - Generic HIV-1 CV (Biocentric)	24/68 (35%)	16/83 (19%)	65 (54-76)	81 (73-89)	74 (67-81)	1/98 (1%)	26/53 (49%)	99 (97-100)	51 (38-65)	82 (76-88)	89	49 (55%)

^aFaux-positifs sont les échantillons avec CV < 1 000 copies/mL sur plasma mais $\geq 1\ 000$ copies/mL sur DBS. ^bFaux-négatifs sont les échantillons avec CV $\geq 1\ 000$ copies/mL sur plasma mais < 1 000 copies/mL sur DBS. ^cFaux-positifs sont les échantillons avec CV < 5 000 copies/mL sur plasma mais $\geq 5\ 000$ copies/mL sur DBS. ^dFaux-négatifs sont les échantillons avec CV $\geq 5\ 000$ copies/mL sur plasma mais < 5 000 copies/mL sur DBS. Les résultats de pourcentages $\geq 80\%$ sont surlignés en gras. Sp : spécificité. Se : sensibilité. IC : intervalle de confiance. *1 échantillon épuisé.

4.4.5 Comparaison des CV DBS mesurées avec les tests Abbott RealTime HIV-1, RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor et Generic HIV CV

Après avoir démontré que les acides nucléiques des DBS sont extraits de façon comparable avec les extractions Abbott et NucliSENS, nous avons finalement comparé les CV DBS mesurées avec les 3 kits suivants : RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor, Abbott RealTime HIV-1 (Abbott) et Generic HIV CV (Biocentric) (**Tableau 9**). La valeur de CV plasmatique de référence était celle du test CV RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor. Avec le test de CV Abbott, le pourcentage de DBS faux-positifs aux seuils de 1 000 (42%) et 5 000 copies/mL (11%) était comparable aux tests RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor (40% et 8%, respectivement) et Biocentric (35 et 1%, respectivement). Nous avons aussi observé un pourcentage similaire de DBS faux-négatifs au seuil de 1 000 copies/mL (17%) avec le test Abbott par rapport aux tests RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor (17%) et Biocentric (19%). Au seuil 5 000 copies/mL, le pourcentage de DBS faux-négatifs était inférieur avec Abbott (25%) par rapport aux tests VIH-1/SIVcpz/SIVgor (42%) et Biocentric (49%). La meilleure quantification plasmatique des tests RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor ($d = +0.47 \log_{10}$ copies/mL) et Biocentric par rapport au test Abbott peut expliquer ces résultats (**Chapitre 3**).

4.5 Discussion

Dans cette étude nous avons sélectionné 151 paires de plasma et de DBS, dont la majorité avait des CV plasmatiques $\leq 10\,000$ copies/mL ($> 70\%$), afin de comparer la capacité de 3 méthodes d'extraction à éliminer ou réduire l'ADN des DBS, par rapport à l'extraction NucliSENS, couramment utilisée sur DBS (Monleau et al., 2009). Dernièrement, l'OMS a proposé d'abaisser le seuil d'échec virologique de 5 000 à 1 000 copies/mL sur DBS (WHO, 2016a). Avec l'extraction NucliSENS et Abbott, environ 40% des patients de notre étude seraient candidats à une CV de confirmation après un renforcement de l'observance, si le seuil de 1 000 copies/mL était appliqué aux DBS, comme pour le plasma. Ces faux-positifs étaient principalement dus à l'amplification de l'ADN pro-virale dans les faibles CV, comme décrit précédemment avec les tests de CV RT-qPCR ouverts et commerciaux (Monleau et al., 2014; Parkin, 2014; Zida et al., 2016). Ainsi, l'utilisation du seuil de 5 000 copies/mL sur DBS permettrait de réduire cette proportion à 10% environ.

En comparant l'extraction Abbott par rapport à l'extraction NucliSENS sur 88 paires quantifiables de DBS, nous n'avons pas observé de diminution des valeurs de CV dans les faibles CV, ce qui devrait pourtant être le cas si Abbott extrayait moins l'ADN pro-virale que NucliSENS. De façon générale, nous avons observé une bonne concordance entre les valeurs, et l'extraction Abbott avait même des CV légèrement supérieures, par rapport à l'extraction NucliSENS ($d = +0,17 \log_{10}$ copies/mL). Ces résultats montrent que l'extraction Abbott sur DBS ne réduit pas l'impact de l'ADN pro-viral, et que lorsqu'elle est couplée à un système de CV RT-qPCR ouvert, l'ADN pro-viral est amplifié de façon comparable aux extraits obtenus avec NucliSENS. De plus, les pourcentages de DBS faux-positifs obtenus avec l'extraction Abbott couplée au test Abbott RealTime HIV-1 (Abbott) étaient comparables à ceux des extractions NucliSENS couplées aux tests RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor et Biocentric, comparé aux CV plasmatiques RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor. Comme le test de CV Abbott possède une LDI plasmatique plus faible (40 copies/mL) que test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor (~500 copies/mL), il est possible que certains DBS faux-positifs au seuil de 1 000 copies/mL soient mieux détectés sur plasma avec le test de CV Abbott qu'avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor. Toutefois, il est peu probable qu'ils le soient au-delà de 1 000 copies/mL, car le test de CV Abbott a des valeurs de CV plasmatiques inférieures d'environ $0,5 \log_{10}$ copies/mL par rapport au test VIH-1/SIVcpz/SIVgor (**Chapitre 3**).

Même si l'absence des données concernant la CV Abbott sur plasma limite l'analyse, ces résultats montrent qu'il est possible d'observer un nombre beaucoup plus élevé de DBS faux-positifs que ce qui a déjà été décrit pour ce test sur DBS (Monleau et al., 2014; Parkin, 2014). Actuellement, celui-ci n'est pas encore commercialisé et son utilisation est destinée à la recherche. Ces résultats préliminaires montrent l'importance de faire d'autres études pour tester la spécificité des CV DBS par rapport aux CV plasmatiques avec le test Abbott RealTime HIV-1, en incluant un grand nombre d'échantillons de CV plasmatique < 1 000 copies/mL.

Avec les extractions Abbott et NucliSENS, nous avons obtenu un nombre de DBS faux-négatifs ($\leq 20\%$) deux à quatre fois supérieur à ce qui est généralement décrit avec les tests de CV RT-qPCR ouverts et commerciaux, au seuil de 1 000 copies/mL (Monleau et al., 2014; Parkin, 2014) WHO, 2016. Au seuil de 5 000 copies/mL, la proportion de faux-négatifs était de 34% et 42% avec les extractions Abbott et NucliSENS. Ces résultats sont liés à la fois à la

composition du panel (< 10 000 copies/mL pour 75%) mais aussi à la sous-quantification de 0,4 à 0,6 log₁₀ cp/mL mesurée sur DBS, comparés aux CV plasmatiques, mais aussi à la composition du panel (< 10 000 copies/mL pour 75%). Certaines études peuvent inclure des patients naïfs de TAR ou ayant des CV plasmatiques élevées, ce qui améliore la sensibilité, mais surtout, la plupart des tests ajoute un facteur correctif qui tient compte notamment de l'hématocrite (Marconi et al., 2009; Neogi et al., 2012; Reigadas et al., 2009; Vidya et al., 2012; Viljoen et al., 2010).

Le traitement DNase avait un impact majeur sur l'ADN mais aussi sur l'ARN, puisque qu'aucun faux-positif n'a été observé. Cependant, cet effet était contrebalancé par une sensibilité largement insuffisante, d'environ 20% au seuil de 5 000 copies/mL. Les rares patients dont l'échec virologique était correctement diagnostiqué sur DBS avaient généralement des CV plasmatiques > 10 000 copies/mL et des CV DBS significativement très inférieures d'1,0 log₁₀ copies/mL. Même si les conditions du protocole du kit Turbo DNase-free (Ambion) ont été respectées, il est probable que soit l'ARN ait été dégradé par certains cations divalents (Calcium ou Magnésium), soit la RT-PCR ait été inhibée par certains sels ou réactifs de l'agent d'inactivation de la DNase ou parfois même du tampon DNase. Le traitement DNase d'extraits DBS en vue de réaliser une CV par RT-qPCR a précédemment été testé une seule fois, avec le test Biocentric. En utilisant le même kit que dans cette étude, il avait été montré que la cinétique des CV DBS était semblable à celle des CV plasmatiques, sur un nombre réduit de 13 patients (Viljoen et al., 2010). Cependant, le kit Turbo DNase-free n'est pas celui que Biocentric recommande d'utiliser dans sa nouvelle note d'application concernant la quantification sur DBS, publiée en janvier 2016. Il utilise le kit Heat&Run gDNA (ArticZymes) qui a l'avantage d'inactiver la DNase par chauffage à 55°C et non pas avec un agent d'inactivation capable d'inhiber aussi la RT-PCR.

L'élution PBS avait un impact important sur l'ADN, puisque la proportion de faux-positifs (18%) était environ deux fois inférieure aux extractions Abbott et NucliSENS au seuil de 1 000 copies/mL. Malgré cette amélioration, cette proportion demeurait élevée et supérieure à celle précédemment décrite avec le test AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 (10%) au seuil de 1 000 copies/mL (Wu et al., 2015). Au seuil de 5 000 copies/mL, la proportion de faux-positifs était très faible (1%) mais celle des faux-négatifs était élevée (51%), comme avec les

extractions Abbott et BioMérieux. Cela s'explique probablement du fait de la composition du panel mais aussi d'une sous-quantification importante avec l'élution PBS. En effet, les quantités importantes mesurées sur les spots résiduels suggèrent que l'élution PBS pourrait avoir une efficacité insuffisante, en éluant de façon incomplète l'ARN des CV plasmatiques élevées (> 10 000 copies/mL).

4.6 Conclusion et perspectives

Cette étude montre que l'extraction Abbott ne réduit pas l'impact de l'ADN proviral et qu'elle est comparable à l'extraction NucliSENS qui extrait tous les acides nucléiques. L'élution PBS réduit l'impact de l'ADN mais de façon encore insuffisante au seuil de 1 000 copies/mL. Avec les tests de CV par RT-qPCR ouverts et la plupart des tests commerciaux, de nombreux patients seraient candidats à une CV de confirmation, voire à un changement pour un traitement de 2^{ème} ligne, de façon inappropriée, induisant un surcoût programmatique dans les pays du Sud (Inzaule et al., 2016b). Concernant le traitement DNase, aucune étude n'a encore montré son efficacité pour définir l'échec virologique à grande échelle sur DBS. Il existe probablement des différences de performance entre les kits, d'où la nécessité de continuer à les tester pour à la fois connaître ceux qui peuvent être utilisés dans le cadre du suivi virologique sur DBS, mais aussi définir des protocoles détaillés en vue d'un usage à grande échelle.

Dans les pays du Sud, la plupart des patients sous TAR sont actuellement suivis selon les critères cliniques et immunologiques qui sont un mauvais prédicteur de l'échec virologique. Dans ce contexte, le nombre de patients en échec virologique avec de faibles CV plasmatiques comprises entre 1 000 et 5 000 copies/mL est potentiellement limité. Dans une récente étude réalisée chez environ 450 patients en échec de 1^{ère} ligne au Cameroun, au Burkina-Faso et au Sénégal, la CV médiane était de 4,5 log₁₀ copies/mL (Ciaffi et al., 2015). Face à la nécessité de faire le passage à l'échelle de la CV, le seuil de 5 000 copies/mL, semble représenter actuellement le meilleur compromis pour réaliser des CV par RT-PCR à grande échelle sur DBS (Balinda et al., 2016; Boillot et al., 2016; Parkin, 2014; Rutstein et al., 2014). Avec ces techniques, l'interprétation des résultats sur DBS est différente du plasma : 1) CV DBS > 5 000 copies/mL correspond a priori à un échec virologique ; 2) CV DBS indétectable correspond à

priori à un succès virologique, mais il existe un risque qu'une CV plasmatique relativement faible (< 10 000 copies/mL) n'ait pu être quantifiée ; 3) CV DBS comprise entre 1 000 et 5 000 copies/mL est par défaut considérée comme un succès virologique car elle peut correspondre à un résultat faux-positif lié à l'amplification de l'ADN pro-viral, mais ça peut être aussi un échec virologique. Le seuil de 1 000 copies/mL semble adapté aux techniques basées sur l'amplification isothermale de l'ARN (NASBA), d'autant que la sensibilité observée est inférieure à celle des techniques de RT-PCR (Fajardo et al., 2014; Mercier-Delarue et al., 2014; Parkin, 2014). Lors de la mise en place du suivi virologique sur DBS, au-delà des formations techniques, il sera nécessaire de former les biologistes et les cliniciens à l'interprétation des résultats, notamment en les sensibilisant aux limites liées aux prélèvements DBS comparés au plasma, en fonction des techniques de CV utilisées. Le plasma doit d'ailleurs continuer à être utilisé toutes les fois où c'est possible.

De façon générale, il faut continuer à tester l'efficacité des différents kits ouverts et commerciaux sur DBS, en comparant les CV DBS par rapport aux CV plasmatiques dans les conditions réelles de suivi virologique de patients sous TAR, en incluant les patients en succès virologique, qui représentent la grande majorité (>80%) des patients traités dans les pays du Sud (Boender et al., 2015a). Réalisés à partir de sang total, le développement et la mise en place des tests simples de CV (*point of care*, en anglais) risquent d'être également confrontés aux problèmes causés par l'impact de l'ADN pro-viral. L'arrivée des stratégies alternatives, à la fois au plasma et à la CV complexe, va nécessiter de nouvelles études pour évaluer l'efficacité d'algorithmes d'interprétation des résultats, qui tiendraient compte des différentes limites techniques, afin de proposer un suivi virologique adapté dans les pays du Sud.

4.7 Analyses complémentaires : Comparaison des tests VIH-1/SIVcpz/SIVgor et Generic HIV Charge virale (Biocentric) pour la mesure des charges virales plasmatiques

Sur les 83 échantillons de CV RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor > 1 000 copies/mL, 70 (84%) échantillons avaient aussi une CV Biocentric > 1 000 copies/mL. Sur les 68 échantillons de CV RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor < 1 000 copies/mL, 61 (89%) échantillons avaient aussi une CV Biocentric < 1 000 copies/mL. Au total, 87% (131/151) des résultats de CV plasmatique étaient concordants au seuil de 1 000 copies/mL. De plus, 84 paires de plasma étaient quantifiables avec les deux tests de CV et nous avons observé une bonne corrélation ($r = 0,89$; $p < 0,001$) et une bonne concordance ($r = -0,07$; $p = 0,52$) entre les deux mesures (**Figure 42**).

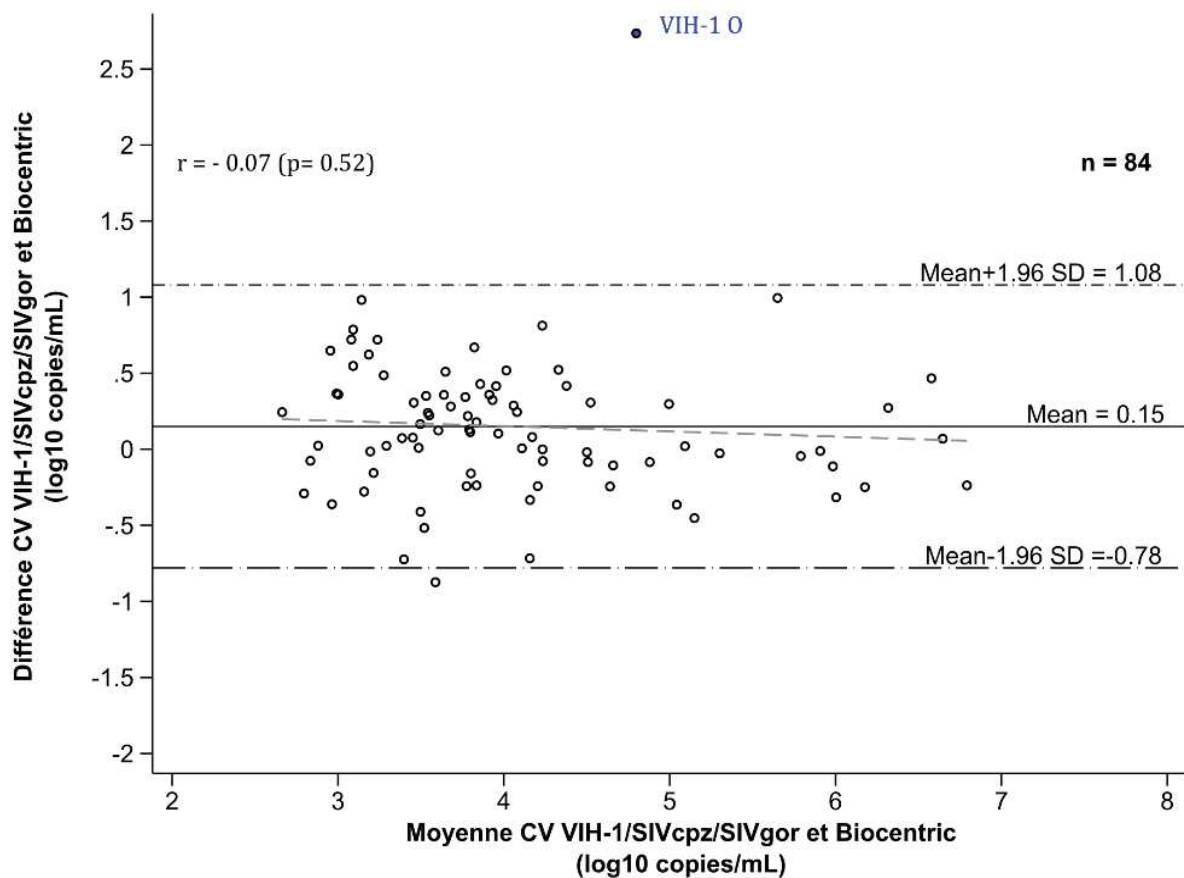


Figure 56. Analyse de la concordance par Bland-Altman du test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor par rapport au test Biocentric pour mesurer la CV sur toutes les paires quantifiables.

Le VIH-1 groupe O est indiqué en bleu.

Le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor avait des valeurs supérieures de $0,15 \log_{10}$ copies/mL ($p=0.005$) par rapport au test Biocentric. Seulement 2/84 (0,2%) échantillons étaient à l'extérieur des limites d'agrément, avec une différence de valeur aberrante ($2,74 \log_{10}$ copies/mL), correspondant à la sous-quantification d'un VIH-1 groupe O par Biocentric ($CV_{RT-qPCR \text{ VIH-1/SIVcpz/SIVgor}} = 6,17 \log_{10}$ copies/mL). L'autre VIH-1 O présent dans cette étude était aussi quantifié avec le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor ($CV = 4,17 \log_{10}$ copies/mL), alors qu'il était détecté sous le seuil de quantification avec Biocentric ($CV < 2,48 \log_{10}$ copies/mL). La détection des échantillons VIH-1 groupe O avait été réalisée par sérotypage, avec un test ELISA utilisant les peptides V3 des groupes M, N,O et P (Villabona-Arenas et al., 2015).

Le test Biocentric n'est pas capable de détecter correctement les VIH-1 groupes O, contrairement au test ouvert RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor qui détecte mieux les VIH-1 O que le test commercial CV Abbott RealTime HIV-1 (Etienne et al., 2013). En retirant l'échantillon discordant VIH-1 O, la différence moyenne entre les tests restait sensiblement la même ($d= 0,12 \log_{10}$ copies/mL), les valeurs étaient moins dispersées, et 5/83 (6%) des échantillons étaient en dehors des nouvelles limites de concordance. Au final, 20% (18/84) des échantillons avait une différence $> 0,5 \log_{10}$ copies/mL entre les deux tests. Ces résultats, obtenus dans un contexte de suivi virologique de routine au laboratoire du CREMER de Yaoundé au Cameroun, confirment ce qui a été décrit lors du développement du test VIH-1/SIVcpz/SIVgor au laboratoire UMI 233 de Montpellier en France (Etienne et al., 2013).

Conclusion et perspectives

En conclusion, les principaux résultats obtenus seront discutés, puis des perspectives de recherche et des recommandations opérationnelles seront proposées afin d'améliorer la prise en charge des patients vivant dans les pays du Sud, et notamment en Afrique sub-saharienne.

Discussion

1. Résistances acquises aux ARVs après une longue durée de TAR

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier la résistance acquise (ADR, *acquired drug resistance* en anglais) après une longue durée de TAR de 1^{ère} ligne dans les zones urbaines et décentralisées des pays du Sud (**Chapitres 1 et 2, partie travaux de thèse**). Les principaux résultats sont les suivants :

(1) Une multi-résistance élevée (97%) est observée chez les patients en échec virologique après une longue durée de TAR de 1^{ère} ligne. Les principales mutations étaient M184VI (97%), K103NS (54%) et Y181CIV (26%), conférant respectivement la résistance au 3TC et EFV/NVP chez ces patients traités ayant une durée médiane d'environ 4 ans et vivant au Burkina-Faso, Cameroun et Sénégal (n=451). Plus de la moitié d'entre eux avaient aussi accumulé des mutations (T215YF (48%) et autres TAMs) conférant la résistance à AZT/d4T et ainsi, plus aucun des trois ARVs administrés n'était pharmacologiquement actif.

(2) Le diagnostic tardif de l'échec virologique peut compromettre l'efficacité des INNTIs de 2^{ème} génération de façon importante, et aussi celle d'INTIs recommandés en 2^{ème} ligne par l'OMS. Dans notre étude, plus d'un patient sur deux avait une résistance croisée à RPV et plus d'un sur trois à ETR. Des résistances croisées aux INTIs ont été observées à la fois avec ABC, DDI et aussi TDF, qui est actuellement recommandé par l'OMS en TAR de 2^{ème} ligne.

(3) Des charges virales élevées ne reflètent pas toujours un problème d'observance chez les patients sous TAR de 1^{ère} ligne mais sont aussi associées à une multi-résistance dans les pays du Sud. La proportion de souches résistantes à toutes les molécules du TAR, qui

avaient aussi accumulé de nombreuses mutations, était plus élevée (78%) chez les patients avec une CV > 5,0 log₁₀ copies/mL. Par conséquent, la proportion de résistances croisées aux INTIs était également plus importante chez ces patients, d'ailleurs largement asymptomatiques.

(4) Les taux d'échec virologique et de résistance au TAR sont aussi une préoccupation majeure en zone décentralisée. L'étude menée au sein d'un hôpital de district au Cameroun a rapporté des prévalences d'échec virologique et de résistance variables qui augmentaient avec la durée de TAR (n=407), avec respectivement : de 12% et 8% pour le groupe « 6-12 mois » à 31% et 27% pour le groupe « > 6 ans ».

Avec les travaux de la première étude (**Chapitre 1**), les données sur les résistances après une longue durée de TAR (> 3ans) en zone urbaine, au Burkina-Faso (Bobo Dioulasso) et au Sénégal (Dakar) ont été rapportées pour la première fois dans cette thèse (2010-2012). Au Cameroun, une précédente étude (2008-2009) avait rapporté des prévalences de multi-résistance plus faibles, avec environ 80% de résistance au 3TC + EFV/NVP et environ 20% aux trois molécules du TAR (Aghokeng et al., 2013). Elle avait été menée à l'Hôpital Central de Yaoundé, un des deux mêmes sites inclus dans notre étude. Malgré ces premiers résultats préoccupants chez les patients sous TAR depuis > 3 ans, nos résultats montrent que la prise en charge des patients camerounais vivant en zone urbaine ne s'est pas améliorée entre ces deux périodes (**Figure 56**). Ils démontrent l'efficacité insuffisante des programmes et services de TAR, ce qui a aussi été relevé « en amont » lors de la dernière enquête concernant les indicateurs d'alerte précoce (EWI, *early warning indicators* en anglais), menée en 2013 sur 15 sites au Cameroun (10 urbains et 5 ruraux) (Fokam et al., 2015; WHO, 2016b).

De façon générale, cette étude a mis en exergue les disparités entre les zones urbaines et décentralisées, pour les indicateurs suivants : EW1 (> 90% d'observance, mesurée par le retrait des ARV dans les délais), 57% en urbain vs 0% en rural ; EW2 (> 85% de rétention dans les soins à 12 mois), 78% en urbain vs 50% en rural ; EW3 (100% d'absence de rupture de stocks à la pharmacie), 11% en urbain vs 25% en rural (Fokam et al., 2015). Dans le détail, EW3 variait extrêmement d'un site à l'autre, indépendamment de la zone géographique, suggérant que les problèmes d'approvisionnement en ARVs semblent liés à la gestion interne de chacun des sites (**Figure 56**). Les résultats de cette étude contrastent avec ce qui a pu être

observé dans le même contexte dans certains pays du Sud de l’Afrique, comme en Namibie (Jonas et al., 2014). Au Cameroun, le test de CV est disponible dans les deux capitales du pays : Yaoundé et Douala. Etant jusqu’ici assez cher et à la charge du patient (25 000 FCFA ~ 40 euros), il était souvent réalisé en cas de suspicion d’échec clinique ou immunologique chez les patients pouvant le payer, et donc tardivement. Récemment, son coût a été diminué et l’Institut Pasteur de Yaoundé propose désormais un test dont le prix varie autour de 10 000 FCFA (~15 euros) : <http://www.pasteur-yaounde.org/files/catalogue2016.pdf>.

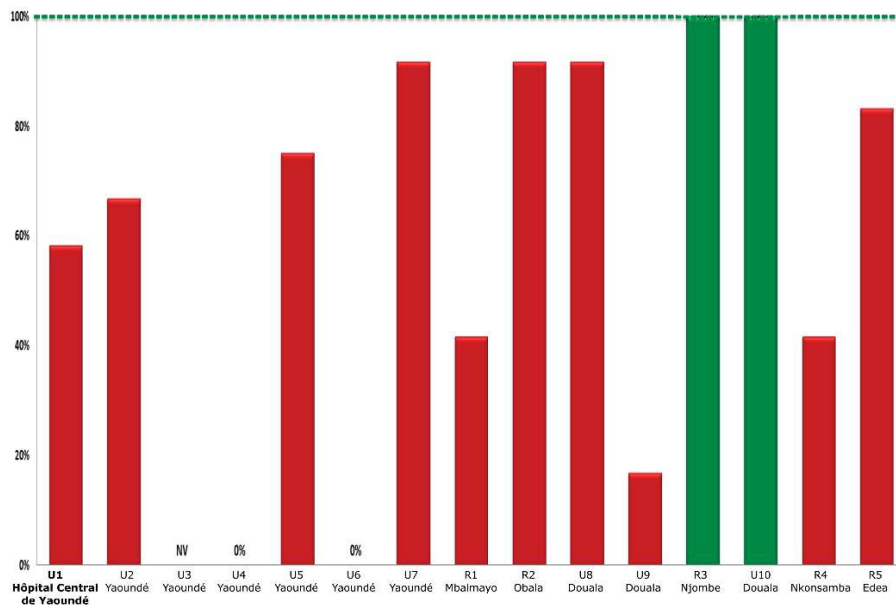


Figure 57. Performance de l’indicateur EW3 « pas de rupture de stock » sur 13 sites urbains (U) et ruraux (R) étudiés en 2013 au Cameroun.

NV : non validé. Les sites avec des « bonne performance » (100% d’absence de rupture de stock) sont indiqués en vert et les sites avec des « mauvaises performances » (< 100% d’absence de rupture de stock) sont indiqués en rouge). Dans cette étude EW3 varie entre : 0 et 92% à Yaoundé, en fonction des différents sites (U1-U7) ; 17% et 100% à Doula (U8-U10) ; 42% et 100% en zone décentralisée (R1-R5).

Nos travaux montrent aussi, comme déjà observé, que l’ADR augmente effectivement avec la durée de TAR dans les pays du Sud (Hosseinipour et al., 2013; Sigaloff et al., 2011a; Stadel et Richman, 2012). En plus des mutations (M184V, K103NS et Y181CIV), davantage de patients accumulent des mutations de type TAMs, conférant la résistance croisée aux INTIs au fil du temps passé en échec virologique. Cette tendance a aussi été clairement mise en évidence dans notre deuxième étude évaluant le succès du TAR de 1^{ère} ligne en zone rurale. Par ailleurs, nous n’avons pas observé de différence de prévalence d’ADR entre les trois pays, comme cela a été précédemment décrit après 24 mois de TAR dans ces mêmes pays (63% au

Burkina-Faso, 75% au Cameroun, et 83% au Sénégal) (Aghokeng et al., 2014). Même si des différences de performances peuvent exister entre les programmes de TAR de différents pays et à l'intérieur des pays, il est très probable qu'en l'absence de diagnostic précoce de l'échec virologique, des niveaux d'ADR extrêmement élevés émergent chez tous les patients en échec après un TAR de longue durée.

Dans les pays voisins d'Afrique de l'Ouest, quelques données récentes sont disponibles en zone urbaine au Liberia (Monrovia), au Mali (Bamako) et au Togo (Lomé), chez les patients traités respectivement avec une durée médiane de 3 ans et demi, 5 et 6 ans (Fofana et al., 2014; Konou et al., 2015a; Loubet et al., 2015). Alors que la prévalence de la multi-résistance (3TC + INNTI) chez les patients en échec virologique semble plus faible au Mali et au Libéria (60% environ), celle mesurée au Togo est comparable à notre étude avec 98% de souches résistantes à 3TC + EFV/NVP et 63% aux trois molécules du TAR de 1^{ère} ligne. Même si la majorité des patients sont résistants à 3TC, il semble qu'il y ait un avantage à conserver cette molécule dans les TAR de 2^{ème} ligne car la souche mutée (M184VI) diminue le fitness viral et augmenterait la sensibilité au TDF (ou AZT) et probablement aussi à l'IP, administrés en TAR de 2^{ème} ligne (Gallant, 2006; Kumarasamy et al., 2015; WHO, 2016a).

Par contre les mutations à l'EFV/NVP confèrent aussi une résistance importante aux INNTIs de 2^{ème} génération. Leur prévalence peut être estimée ainsi : ETR (22-36%) et RPV (42%-65%) ; en couplant nos résultats avec ceux des études menées au Mali, Togo et Libéria, chez les patients traités depuis une longue durée (Fofana et al., 2014; Konou et al., 2015a; Loubet et al., 2015). Il est clair que dans ces conditions, ces molécules ne peuvent plus être utilisées dans les TAR de 2^{ème} ligne, d'autant plus que leur barrière génétique reste faible comparée aux IPs. La prévalence de résistance au TDF (10%) observée dans notre étude était similaire au Togo mais deux fois inférieure au Mali et au Libéria (25%) car une partie des patients recevaient déjà cette molécule en TAR de 1^{ère} ligne (10-15%). Dans notre étude, 10% de patients supplémentaires avaient aussi une résistance intermédiaire au TDF, signifiant que la sélection d'une seule autre TAMs suffit pour acquérir une résistance au TDF. Au final, 20 % des patients de notre étude ne bénéficieront pas de TDF entièrement fonctionnel en TAR de 2^{ème} ligne, contrairement aux patients ayant acquis directement la K65R qui peuvent être encore sensibles à l'AZT proposé en TAR de 2^{ème} ligne (en l'absence aussi d'accumulation de TAMs).

On peut noter qu'une limite de ces études est l'absence de test génotypique de résistance pré-thérapeutique, qui tient compte de la résistance transmise. Toutefois, la résistance transmise était encore faible dans les pays de notre étude (< 5%) en 2010 et elle ne peut donc pas à priori expliquer ces résultats très préoccupants (OMS, 2012).

Il est généralement admis que plus le virus mute, moins il devient compétent pour se répliquer (Lam et al., 2016; Nijhuis et al., 2001; Yang et al., 2015b). Dans ce cas, on pourrait s'attendre à voir une association entre les virus hautement mutés et des CV plus faibles par rapport aux virus moins mutés. Néanmoins, les résultats de notre première étude ont montré que la grande majorité des patients étaient résistants à plusieurs molécules de leur TAR, et même la proportion de souches résistantes aux trois molécules augmentait avec la CV, indépendamment de la durée du TAR. Par conséquent, la proportion de résistance croisée aux INTIs était également plus importante chez ces patients, d'ailleurs largement asymptomatiques. Ces observations moins communément décrites convergent avec celles d'autres études récentes rapportant aussi des degrés de résistances plus élevés chez les patients ayant des CV élevées (Fofana et al., 2014; Lam et al., 2016; Wallis et al., 2014). Ces données renforcent notre inquiétude face à l'augmentation du risque potentiel de transmission de souches résistantes. Et ce, d'autant plus qu'une augmentation des souches résistantes transmises est déjà observée en Afrique sub-saharienne avec l'augmentation et la durée de la couverture en TAR (Boender et al., 2015b; Gupta et al., 2012; Rhee et al., 2015a). En effet, la CV plasmatique est effectivement le facteur de risque principal de transmission sexuelle du VIH, même si celle-ci est conduite par la CV génitale (Baeten et al., 2011; Quinn et al., 2000). La transmission hétérosexuelle du VIH augmente avec l'augmentation en \log_{10} de la CV, avec un risque pouvant être trois fois plus élevé par \log_{10} d'augmentation (Hughes et al., 2012). Sans véritable amélioration du suivi, au travers d'un accès élargi au test de CV pour diagnostiquer précocement l'échec virologique, ou l'utilisation d'ARVs avec des barrières génétiques plus élevées en 1^{ère} ligne, une nouvelle épidémie potentiellement causée par des souches résistantes aux INNTIs et aux INTIs pourrait émerger en Afrique sub-saharienne (Saenz et Bonhoeffer, 2013).

Notre première étude sur les résistances acquises, menée dans les différentes capitales du Burkina-Faso, du Cameroun et du Sénégal, ne reflète pas forcément ce qui se passe en zone décentralisée. Il est donc important d'évaluer l'efficacité des programmes de gestion et de suivi

du TAR en zone décentralisée. Comme au Gabon, les résultats de notre deuxième étude ont aussi montré qu'il y a probablement des disparités entre les zones géographiques au Cameroun, et que la prise en charge est encore plus mauvaise dans les zones reculées, comme à l'extrême Nord du pays (Fokam et al., 2015; Liégeois et al., 2012; Taieb et al., 2014). Plus récemment en Afrique du Sud, une étude comparative a clairement montré que les patients vivant en zone rurale avaient plus de risque d'échec virologique prolongé et d'accumulation de mutations de résistances, par rapport aux patients vivant en villes ayant accès à un meilleur suivi virologique (Rossouw et al., 2016). Ces disparités n'ont pas été observées dans d'autres pays d'Afrique subsaharienne (Guinée-Conakry et Togo) mais ne sont pas pour autant moins inquiétantes puisque les échecs virologique et résistances observées en ville étaient déjà très élevés dans ces pays (Diouara et al., 2014b; Konou et al., 2015b).

En conclusion de cette première partie de la thèse, nos résultats montrent clairement que l'amélioration du suivi virologique, à travers l'accès à la charge virale en routine est actuellement cruciale pour le succès des programmes de TAR dans les pays du Sud, et à tous les niveaux : (i) pour préserver au maximum la longévité du TAR qui est à vie chez les patients infectés par le VIH et empêcher un succès limité des 2^{ème} lignes de TAR, et ainsi continuer à améliorer la qualité de vie des patients vivant avec le VIH dans les pays du Sud ; (ii) pour limiter le risque de transmission de virus multi-résistants chez les nouveaux patients infectés. En outre, l'amélioration de la prise en charge, à travers l'administration de molécules plus puissantes et à plus haute barrière génétique pourrait aussi permettre un meilleur succès virologique, comme dans les dernières recommandations de l'OMS qui proposent d'utiliser le DTG en 1^{ère} ligne de TAR dans les pays du Sud, en alternative au TDF (WHO, 2016a).

2. Amélioration du suivi virologique dans les pays du Sud

Le deuxième objectif était d'évaluer la faisabilité d'un nouveau test de CV ouvert et polyvalent universel sur plasma et sur DBS (**Chapitre 3 et 4**), en vue d'améliorer le suivi virologique réalisé par les laboratoires centralisés mais aussi de rendre la CV disponible dans les zones décentralisées où les infrastructures de laboratoires sont limitées.

Les principaux résultats sont les suivants :

(1) Le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor est transférable dans les pays du Sud, avec une performance au moins équivalente au test Abbott RealTime HIV-1. Avec ce test de CV ouvert et polyvalent universel capable de détecter les VIH-1 M, N, O et P, ainsi que leurs ancêtres simiens, nous avons observé une meilleure quantification des variants du VIH-1 M circulant au Cameroun ($+0.47 \log_{10}$ copies/mL) (n=474), comparé au test Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, USA) approuvé par la FDA et le marquage CE. Au seuil d'échec virologique de l'OMS (1 000 copies/mL), la concordance des résultats entre les deux tests était de 95%, avec une meilleure sensibilité pour le test ouvert. En pratique, ce nouveau test de CV est bien adapté au contexte des pays du Sud, tant par sa capacité à quantifier de tous les VIH-1 circulants que par son accessibilité en termes d'équipements pour les laboratoires déjà expérimentés aux techniques de CV et disposant de plateformes « ouvertes ».

(2) La faible spécificité sur DBS de plupart des tests de CV RT-qPCR pourrait augmenter le nombre de patients en échec virologique au seuil de 1 000 copies/mL et induire un surcoût pour les programmes. En dernier lieu, nous avons comparé différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques pour réduire l'impact de l'ADN pro-viral afin d'améliorer en vain les performances du test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor sur DBS. Nous n'avons pas observé d'amélioration de la spécificité au seuil de 1 000 copies/mL entre l'extraction NucliSENS utilisée couramment au laboratoire et l'extraction Abbott. Nous avons plutôt montré que ces deux techniques d'extractions étaient comparables sur DBS. De plus, en testant d'éluer les particules virales des DBS dans un tampon PBS, d'après un protocole récemment proposé pour le test AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 (Roche), ainsi que de réaliser un traitement par une DNase, nous avons dans les deux cas observé une mauvaise sensibilité, probablement causée respectivement par l'élution incomplète de l'ARN ou sa dégradation par la DNase.

Nous avons finalement montré que le nouveau test ouvert ne peut pas être utilisé au seuil d'échec virologique de 1 000 copies/mL qui vient d'être recommandé par l'OMS, tout comme le test Abbott RealTime HIV-1, et très probablement aucun des tests de CV par RT-PCR. Avec ces tests, de nombreux patients pourraient en effet risquer de devoir refaire une CV de contrôle

de façon inappropriée (voire changer de TAR pour une 2^{ème} ligne), si le même algorithme de diagnostic de l'échec virologique que celui sur plasma était utilisé. D'un point de vue individuel, cela pourrait provoquer une baisse de confiance envers les systèmes de soins chez des patients adhérents pour lesquels il serait proposé à tort un renforcement de l'observance (Inzaule et al., 2016b). D'un point de vue programmatique, cela pourrait engendrer un surcoût pour les pays du Sud. La recommandation de l'OMS d'utiliser les DBS pour le suivi virologique au seuil de 1 000 copies/mL a été faite en l'absence de données de bonne qualité. Les résultats de ces travaux sont donc importants car ils vont contribuer à améliorer la qualité des données disponibles.

Perspectives

Au vue de nos résultats, les questions à venir sont nombreuses : **Quel est l'impact des multi-résistances acquises au cours du TAR de 1^{ère} ligne sur l'efficacité des TAR de 2^{ème} ligne ? Quel est le risque d'épidémie de souche résistante ?** Ces questions sont d'autant plus importantes du fait de l'augmentation de la couverture en TAR dans ces pays avec les recommandations de traités tous les patients infectés par le VIH. Les schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS évoluent aussi, avec le TAR à base de TDF depuis 2013, et les nouvelles stratégies alternatives à base d'EFV₄₀₀ et DTG depuis 2016. L'efficacité de ces molécules a surtout été étudiée dans les pays du Nord et par conséquent, il est nécessaire de l'étudier aussi dans le contexte des pays du Sud. Enfin, nous présenterons brièvement les perspectives de recherche en virologie pour l'amélioration du suivi des patients.

1. Quel est l'impact des multi-résistances acquises au cours du TAR de 1^{ère} ligne sur l'efficacité des TAR de 2^{ème} ligne ?

Dans les pays du Sud, le TAR de 2^{ème} ligne recommandé actuellement par l'OMS est basé sur 1 IP (ATV/r ou LPV/r) associé à une « backbone » d'INTIs (3TC + TDF). Même si les IPs sont effectivement des molécules avec une puissance et une barrière génétique élevées, la monothérapie d'IP n'est pas suffisamment efficace, comme décrit dans plusieurs études conduites dans les pays du Sud (Arribas et al., 2016; Bunupuradah et al., 2012; Ciaffi et al.,

2016; Kumarasamy et al., 2015; Paton et al., 2014). La maintenance ou le renforcement par la 3TC semble améliorer le succès virologique, même chez les patients résistants, comme la M184VI qui diminue le fitness du virus. Finalement, même si le TAR de 2^{ème} ligne possède à priori une meilleure puissance et une plus haute barrière génétique que la 1^{ère} ligne, les nombreuses mutations acquises au cours du TAR de 1^{ère} ligne peuvent potentiellement compromettre son efficacité. Les patients concernés peuvent avoir en plus des CV extrêmement élevées ($> 5 \log_{10}$ copies/mL), comme nous l'avons observé. Les résultats de l'essai clinique associé à notre première étude ont d'ailleurs montré que les patients ayant des CV $> 5 \log_{10}$ copies/mL étaient plus à risque d'échec virologique après 48 semaines de TAR de 2^{ème} ligne mais l'impact de la multi-résistance n'a pas été clairement étudié (Ciaffi et al., 2015). D'autres études ont montré qu'en plus de la CV élevée, la mauvaise observance au TAR pourrait être le déterminant majeur d'un échec de TAR de 2^{ème} ligne (Boyd et al., 2015; La Rosa et al., 2016; Paton, 2015). De façon paradoxale, ces études ont observé que les patients les plus sensibles aux INTIs (GSS > 1) de la 2^{ème} ligne avaient plus de risque d'échouer, probablement à cause d'un problème d'inobservance irrésolu qui était déjà à l'origine de l'échec de la 1^{ère} ligne. Par ailleurs, aucune étude menée dans les pays du Sud n'a encore démontré l'avantage de remplacer la « backbone » d'INTIs par le RAL auxquels les patients sont pourtant tous sensibles (La Rosa et al., 2016; Paton et al., 2014; SECOND-LINE Study Group et al., 2013).

Il est donc nécessaire de connaître l'impact de la multi-résistance sur l'efficacité réelle de la « backbone » d'INTIs dans le contexte du suivi réalisé dans les pays du Sud afin de répondre aux questions suivantes: « Compte-tenu de la toxicité de ces molécules, quel est l'avantage réel à conserver chacun des 2 INTIs alors que certains patients y sont complètement résistants ? » (Hu et al., 2015). A l'inverse : « Est-ce que les patients encore sensibles à AZT/TDF en 2^{ème} ligne de TAR ne conservent pas plus de chance de succès virologique ? ».

Des études sur l'efficacité des TAR de 2^{ème} ligne sont importantes afin d'évaluer la nécessité ou pas des tests de génotypages, l'efficacité des programmes et services de TAR et l'impact sur l'efficacité des TAR de 3^{ème} ligne à venir. Malheureusement, compte tenu de la faible accessibilité au TAR de 2^{ème} ligne dans les pays du Sud, peu de données sont encore disponibles sur l'émergence de la résistance aux IPs (Haas et al., 2015). L'échec virologique (CV > 400 copies/mL) semble varier énormément entre 10-40% après 36 mois de TAR de 2^{ème} ligne (Boender et al., 2016b; Ndahimana et al., 2016; Pujades-Rodríguez et al., 2010).

Même si l'échec virologique observé en 2^{ème} ligne de TAR dans les pays du Sud semble d'abord lié à un problème d'observance (Boyd et al., 2015; Fox et al., 2016), environ 20% des patients avec des CV > 1 000 copies/mL auraient des souches résistantes aux IPs et nécessiteraient un TAR de 3^{ème} ligne (Boender et al., 2016b; Ndahimana et al., 2016). Le restant des patients en échec virologique aurait des souches sensibles (40%) ou résistantes au TAR de 1^{ère} ligne (40%).

Enfin, des stratégies de simplification à base de 3TC + IP sont de plus en plus souvent envisagées dans les pays du Nord mais elles concernent principalement des patients en succès virologique et n'ayant pas de résistance au 3TC (Arribas et al., 2015; Mondy et al., 2015; Perez-Molina et al., 2015). Il est important d'étudier aussi ses stratégies au Sud afin de vérifier qu'elles permettent d'améliorer la qualité de vie des patients, sans augmenter le risque d'émergence aux IPs. C'est le cas de l'étude MOBIDIP « Mono ou Bithérapie d'inhibiteur de de la protéase »/ ANRS 12286, qui est actuellement menée chez une partie des patients de notre première étude. Une partie des patients en succès virologique sous TAR de 2^{ème} ligne (CV < 200 copies/mL depuis plus de 6 mois) ont bénéficié d'un schéma thérapeutique de maintenance composé de 3TC + IP (LPV/r ou DRV/r) *versus* IP seul. Cette étude a clairement montré l'importance de maintenir la 3TC, même chez les patients résistants (Ciaffi et al., 2016).

2. Quel est le risque d'émergence d'une épidémie avec des souches VIH résistantes ?

Il est important de connaître l'impact réel de la multi-résistance que nous avons décrite sur les nouvelles transmissions à VIH dans les pays du Sud. Actuellement, les TAR de 1^{ère} ligne recommandés dans les pays du Sud sont encore fonctionnellement efficaces chez la majorité des patients vivant en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud et du Sud-Est, avec une estimation de la résistance transmise (TDR, *transmitted drug resistance* en anglais) < 5% (Rhee et al., 2015a). Toutefois, la résistance transmise augmenterait d'un facteur 1,1 tous les ans depuis la mise en place du TAR en Afrique sub-saharienne. Comme les études de TDR sont moins faciles à mettre en place chez les populations récemment infectée par le VIH, la résistance pré-thérapeutique (PDR, *pre-treatment drug resistance* en anglais) pourrait permettre dans un premier temps d'évaluer la proportion des souches résistantes aux INNTIs et aux INTIs à l'initiation du TAR et de donner si nécessaire plus rapidement l'alerte aux programmes nationaux sur l'efficacité des 1^{ères} lignes recommandées.

Menées chez les patients initiant un TAR de 1^{ère} ligne, les études de PDR prennent aussi en compte le fait qu'ils aient pu être éventuellement exposés préalablement aux ARVs au cours de l'histoire de leur infection (PTME, prophylaxie post-exposition, PrEP ou traitement antérieur). Sous PrEP, il existe effectivement un risque potentiel soit d'infection avec un virus résistant à 3TC+TDF, soit de sélection d'un virus résistant en cas d'une infection à VIH non diagnostiquée rapidement. Avec l'accès universel au TAR et la mise en place de la PrEP, la surveillance régulière des TDR ou PDR devrait être inscrite dans les programmes nationaux. Dans le cadre de la recherche, il serait aussi intéressant d'utiliser les nouvelles techniques de séquençage NGS afin d'étudier la résistance parmi la population de variants minoritaires, compte tenu du fait que certaines mutations disparaissent rapidement après avoir été transmises.

3. Quel est l'impact de l'accès élargi au TDF en TAR de 1^{ère} ligne sur l'émergence de la résistance acquise dans les pays du Sud ?

Dans notre première étude, les patients recevaient un TAR de 1^{ère} ligne à base d'AZT/d4T qui, du fait de leur toxicité, ne sont désormais plus recommandés en première intention par l'OMS. L'usage du TDF est privilégié au profit de l'AZT depuis 2013 et celui du d4T est déconseillé depuis 2010. Dans notre deuxième étude, menée entre 2013 et 2014, environ 25% des patients de l'hôpital de district étudié au Cameroun bénéficiaient d'un TAR à base de TDF. Il n'y avait pas de différence de réponse virologique entre ces patients et ceux bénéficiant du TAR à base d'AZT, mais la taille de la population étudiée restait limitée. Alors que l'efficacité réelle du TAR de 1^{ère} ligne à base de TDF dans les pays du Sud était mal connue, une grande étude vient de rapporter des résultats alarmant (TenoRES, 2016). Elle a observé que la prévalence de résistance au TDF pouvait atteindre 60% en Afrique sub-saharienne, alors qu'elle avoisinait 20% dans les pays du Nord où les patients bénéficiaient d'un suivi virologique de routine. Ainsi, elle a estimé que 7 à 17% des patients vivant en Afrique sub-saharienne développeraient une résistance au TDF après seulement 1 an de TAR, avec le suivi et la prise en charge tels qu'ils sont menés actuellement.

Dans cette étude l'émergence d'une résistance rapide au TDF était liée à la sélection d'une seule mutation, la K65RN (ou aussi la K70EGQ), et non à l'accumulation de TAMs au cours du temps, comme nous l'avons surtout observé. Or cette mutation est plus souvent observée avec le sous-type C prédomine en Afrique de l'Est et du Sud. En outre, la K65R pourrait aussi être associée à l'échec de TAR de 2^{ème} ligne (Boyd et al., 2015). Ces nouvelles

données très préoccupantes justifient le fait d'étudier plus en détail l'impact de l'accès élargi au TDF en général mais aussi chez les différents variants du VIH-1 M infectant les patients vivant en Afrique de l'Ouest et Centrale.

4. Quel est l'impact de l'arrivée d'EFV₄₀₀ et DTG dans le TAR de 1^{ère} ligne sur l'émergence de la résistance acquise dans les pays du Sud ?

Enfin, des nouveaux schémas alternatifs viennent d'être proposés par l'OMS en TAR de 1^{ère} ligne, à base d'EFV₄₀₀ et de DTG. Ils sont en train d'être évalués au Cameroun, avec le projet NAMSAL/ANRS 12313. La diminution du dosage de l'EFV de 600 à 400 mg a pour objectif de réduire son coût et surtout la survenue d'effets indésirables (ENCORE1 Study Group et al., 2014). Menée dans le contexte de suivi et de prise en charge des pays du Sud, l'étude des résistances acquises chez les patients à venir avec un TAR à base d'EFV₄₀₀ pourrait répondre aux questions suivantes : « est-ce que la baisse de toxicité attendue favorisera plutôt l'amélioration de l'observance des patients et par conséquent, limitera l'émergence de la résistance du VIH à cette molécule de faible barrière génétique ? ». Inversement : « est-ce que la baisse de posologie de l'EFV ne sera pas plutôt favorable à la survenue d'un dosage sous-optimal et par conséquent, à l'émergence encore plus rapide de résistance aux INNTIs qui est déjà très fréquemment rapportée dans les pays du Sud ? ».

L'introduction du DTG en TAR de 1^{ère} ligne est aussi justifiée par sa meilleure tolérance comparée à EFV et surtout par sa plus grande efficacité (comparée à EFV et DRV/r) et sa plus haute barrière génétique (comparée à EFV et aux autres INIs de 1^{ère} génération) (Castagna et al., 2014; Molina et al., 2015; Walmsley et al., 2015; You et al., 2016). Même si ces données sont très encourageantes, il est nécessaire d'étudier son efficacité réelle dans les pays du Sud. De plus, il est important d'étudier de la résistance pour mieux connaître à la fois l'impact sur le TAR de 2^{ème} ligne, la nécessité ou pas de tests de génotypage en échec de 2^{ème} ligne et à plus long terme, les molécules qui seraient encore fonctionnelles en TAR de 3^{ème} ligne en cas de résistance au DTG.

5. Comment continuer la recherche virologique pour améliorer l'accès à la CV ?

- **Concernant le test RT-qPCR VIH-1/SIVcpz/SIVgor**, il est nécessaire de diminuer la limite de détection inférieure plasmatique et d'introduire un contrôle interne, en vue d'une utilisation à large échelle dans le cadre du suivi virologique plasmatique des patients sous TAR. Avec ces améliorations, le nouveau test pourra être utilisé dans les mêmes conditions que d'autres tests de CV ouverts qui sont commercialisés, comme par exemple le test Generic HIV Charge virale.

- **Concernant la CV DBS par RT-qPCR**, il est nécessaire de continuer à étudier d'autres stratégies d'extractions pouvant limiter l'impact de l'ADN pro-viral sur DBS et améliorer la mauvaise spécificité observée dans les échantillons de CV plasmatique faible (< 5 000 copies/mL) et indétectable, avec par exemple d'autres kits de traitement DNase. Dans ce cadre, le kit Heat&Run gDNA (ArticZymes), qui a l'avantage d'inactiver la DNase par chauffage à 55°C et non pas avec un agent d'inactivation capable d'inhiber aussi la RT-PCR, est actuellement en train d'être testé au laboratoire. De façon plus générale, davantage d'études doivent être réalisées pour évaluer et comparer les différentes plateformes de CV DBS dans leur contexte réel d'utilisation à grande échelle sur tous les patients, comme nous l'avons évoqué dans le **Chapitre 4** (partie travaux de thèse).

En parallèle à ces recherches, il serait aussi intéressant d'étudier les nouvelles stratégies pouvant faire évoluer leur usage avec par exemple la mise en place éventuelle des nouveaux tests de POC de CV (Gueudin et al., 2016; Ritchie et al., 2014). Concrètement, le test POC de CV pourrait être réalisé sur les sites situés en zone décentralisée et couplé à un prélèvement DBS, qui permettrait de faire si nécessaire un test génotypique de résistance dans un laboratoire centralisé.

- **Concernant le test géotypage dans les pays du Sud**, la question de son accès et de son utilisation va certainement se poser de plus en plus. A l'avenir, avec l'augmentation des patients sous TAR et l'amélioration de l'accès à la CV, un nombre plus important de patients devraient bénéficier d'un TAR de 2^{ème} ligne. Actuellement, la 3^{ème} ligne de TAR est rarement mise en place et disponible, notamment parce qu'elle coûte six fois plus chère que la 2^{ème} ligne

et quinze fois plus chère que la 1^{ère} ligne de TAR (Inzaule et al., 2016a). Dans ce contexte, il est possible que le test génotypique de résistance soit coût efficace dans le suivi du TAR de 2^{ème} ligne, ce qui n'est pas le cas pour le suivi du TAR de 1^{ère} ligne. Jusqu'ici, son utilisation n'était pas justifiée chez les patients en échec de TAR de 1^{ère} ligne compte tenu de la faible prévalence de résistance transmise rapportée. Cela pourrait être différent si elle continuait d'augmenter de façon importante.

Dans ce domaine, il est aussi nécessaire d'envisager des stratégies adaptées au contexte des pays du Sud. Comme la prise en charge des patients comprend des TAR standardisés, les POC de génotypage sont intéressants. Ils permettent de cibler spécifiquement les mutations associées aux INTI les plus fréquentes (M184V et K65R) ainsi qu'aux INNTI (K103N, Y181C, G190A et V106M), et détecter avec succès presque tous les patients en échec virologique ayant ces mutations (Rhee et al., 2015b). Là encore, la diversité génétique du VIH représente une limite majeure pour le développement à grande échelle de ces tests. Il semble donc très difficile d'améliorer les tests de POC pour la détection des mutations chez les différents variants du VIH-1 et aussi pour les mutations aux IPs si on souhaite les utiliser à l'avenir pour le suivi des patients sous TAR de 2^{ème} ligne.

Recommandations opérationnelles

En conclusion, une proposition des principales recommandations opérationnelles sont présentées dans le **Tableau 8**, afin de continuer d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients vivant avec le VIH dans les pays du Sud, sous forme de tableau.

La mise en place de l'accès élargi à la charge virale représente un véritable défi pour les pays du Sud. Il semble assez clair qu'elle nécessite une volonté politique forte, traduite par une implication financière importante, pouvant être estimée à 15% du total du budget consacré aux programmes nationaux de lutte contre le VIH/SIDA (Roberts et al., 2016). Pour cela, les gouvernements et les programmes nationaux peuvent déjà s'appuyer sur les succès et les difficultés rencontrés par des pays qui ont débuté la mise à l'échelle, comme l'Afrique du Sud, en Afrique de l'Est (Kenya, Malawi, Namibie, Tanzanie et Ouganda) et de l'Ouest (Côte d'Ivoire), qui sont cependant encore très largement dépendants de l'aide financière internationale pour la majorité d'entre-eux (Lecher et al., 2015).

Il est important de souligner que l'observance est la clé de voûte du succès du TAR. Sans cela, aucune molécule plus puissante, ni aucun suivi virologique n'empêcheront l'émergence de la résistance. Par conséquent, il est indispensable d'améliorer davantage la gestion de l'approvisionnement en ARVs dans les endroits où des ruptures de stocks ont été rapportées. Il en est de même pour l'approvisionnement en réactifs pour les laboratoires. Pour compléter, la formation du personnel de santé au soutien à l'observance doit être renforcée avec la mise en place de la charge virale. La prise en compte du mode de vie des patients et l'accompagnement psycho-social en cas de besoin sont en effet des éléments clés d'une prise en charge réussie. A ce titre, il est intéressant de mettre en place des programmes à l'attention des populations très vulnérables (ex. jeunes filles, personnes handicapés) et discriminées (ex. HSH, travailleuses du sexe).

Tableau 10. Proposition des recommandations opérationnelles basées sur ce travail de thèse.

Programmes nationaux de lutte contre le VIH/SIDA
<p>(1) Maitriser les systèmes d’approvisionnement et de distribution des ARVs pour éviter les ruptures de stock</p> <p>(2) Mettre en place l’accès élargi au TAR pour tous les patients</p> <p>(3) Mettre en place l’accès élargi à la charge virale afin de diagnostiquer précocement les patients en échec virologique et limiter l’émergence de la résistance</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Renforcer les capacités des laboratoires <ul style="list-style-type: none"> ⇒ formation des personnels de laboratoire aux techniques de CV complexes, DBS ⇒ maîtrise des systèmes d’approvisionnement de distribution des réactifs pour éviter les ruptures de stock de réactifs ⇒ maîtrise des systèmes de maintenance indispensables aux équipements complexes ⇒ mise en place d’un système de qualité ⇒ adaptation des infrastructures lorsque c’est nécessaire (climatisation, mise en place d’un circuit unidirectionnel...) ⇒ équipements si nécessaire, avec notamment des plateformes de CV complexes adaptées pour quantifier la diversité génétique des VIH ✓ Former les médecins à l’interprétation des résultats ✓ Renforcer les capacités d’accompagnement psycho-social des patients et d’aide à l’observance ✓ Privilégier la CV sur plasma partout où c’est réalisable ✓ Proposer des stratégies pour rendre accessible la CV dans les zones décentralisées, en fonction des infrastructures disponibles <p>(4) Améliorer l’accès aux 2^{ème} lignes de TAR et rendre disponible les 3^{ème} lignes afin d’améliorer la qualité de vie des patients en échec virologique et réduire la transmission du VIH</p> <p>(5) Surveiller davantage la résistance à l’échelle nationale, en suivant les recommandations OMS</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Mener plus régulièrement des études des indicateurs d’alerte précoces ✓ Mettre en place des études sur les résistances acquises et pré-thérapeutiques
Médecins prescripteurs d’antirétroviraux et personnels de Santé
<p>(1) Renforcer l’éducation thérapeutique pour favoriser l’observance des patients</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ S’appuyer davantage sur les agents de relais communautaires pouvant se déplacer au domicile des patients <p>(2) Mettre tous les patients infectés sous TAR, quelque soit la mesure des CD4</p> <p>(3) Réaliser les changements de TAR sur la base des résultats des tests de charge virale</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Utiliser l’algorithme de l’OMS sur plasma : 2 CV > 1 000 copies/mL à 3-6 mois d’intervalle avec un renforcement de l’observance ✓ Interpréter avec plus de précautions les résultats éventuels sur DBS jusqu’à ce qu’il y ait plus de données disponibles <p>(4) En cas d’échec de 2^{ème} ligne, réaliser si possible un test génotypique de résistance</p>
Personnels de laboratoire
<p>(1) Améliorer le circuit de rendu des résultats d’analyses biologique</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ecourter davantage les délais de rendu <p>(2) Maitriser les techniques de CV complexes utilisées</p> <p>(3) Continuer d’améliorer la qualité</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Maitriser les bonnes pratiques de laboratoire ✓ Participer aux contrôles de qualité de la charge virale

La priorité doit être aussi donnée au renforcement des capacités des laboratoires. Le manque de personnel formé représente un frein important à la mise en place de la charge virale (Lecher et al., 2015). Un nombre suffisant de personnel de laboratoire doit être formé à ces techniques, ainsi qu'à la gestion de la qualité, à la maintenance des appareils... En outre, il est important de former le personnel de santé chargé du suivi des patients à l'interprétation des résultats de CV afin qu'une réelle amélioration de leur prise en charge puisse être observée. Il est important de référencer les laboratoires centralisés et d'organiser la réalisation de la charge virale sur tout le territoire, en faisant une utilisation optimale des équipements afin de réduire les coûts. Il faudrait améliorer les infrastructures de nombreux laboratoires, en tenant compte des frais de maintenance engagés sur le long terme, avec par exemple les équipements de plateformes de CV complexes. Ensuite, il est nécessaire d'étudier comment mettre en place la CV en zone décentralisées. Quelques précisions techniques sont apportées sur ces deux derniers points étudiés au cours de cette thèse :

- **Techniques de CV complexes dans les laboratoires centralisés**

Actuellement, il existe différentes plateformes de CV commerciales et ouvertes permettent généralement de réaliser correctement les tests de CV VIH plasmatique dans les pays du Sud. Toutefois, ces travaux de thèse montrent bien qu'aucune plateforme de CV n'est parfaite, même celles commercialisées et approuvées par la FDA et le marquage CE. C'est lié à la fois à la grande diversité génétique du VIH et aussi aux différentes techniques de CV, sondes et amorces utilisées pour chacun des tests. Ainsi, ils ont montré l'intérêt d'avoir accès à différents tests dans les laboratoires nationaux de référence, puisque leurs résultats ont un impact majeur sur la prise en charge clinique du patient. Dans le cadre de la mise en place de l'accès élargi à la CV, chaque pays devrait pouvoir analyser ses besoins en termes qualitatifs (diversité génétique des VIH circulants) et quantitatifs (nombre de tests de CV nécessaires pour un accès élargi à tous les patients sous TAR) afin d'optimiser au mieux la précision des résultats rendus et le coût des tests de CV.

- **La CV en zones décentralisées**

Les DBS continuent de représenter une alternative intéressante pour rendre la CV accessible en zones décentralisées où la réalisation, la conservation et/ou le transport des prélèvements plasmatiques ne sont pas envisageables. Cependant, en l'état actuel des connaissances et de nos résultats, leurs conditions d'application à grande échelle restent

difficiles à définir et les recommandations de l’OMS doivent être prises avec beaucoup de précaution. Actuellement, la technique NASBA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0, BioMérieux) possède la meilleure spécificité (96-100%) sur DBS car elle n’amplifie pas l’ADN des DBS. Ainsi, elle peut être utilisée pour évaluer l’échec virologique et la résistance dans certains pays du Sud . Par contre, elle détecte à priori moins bien certains sous-types et variants du VIH-1 M, comme le VIH-1 G CRF01_AE, CRF02_AG, CRF08_BC, comme nous l’avons décrit en synthèse bibliographique. Les techniques de POC de CV, en cours de commercialisation, auront aussi probablement des inconvénients car elles sont encore toutes réalisées sur plasma et elles nécessiteront également la formation de personnel et la mise en place de contrôles de qualité (Gomes et al., 2013; Mor et al., 2015; Mouinga-Ondémé et al., 2014; Ndiaye et al., 2015; Tatarelli et al., 2016; Xu et al., 2012). Dans tous les cas, la mise en place d’un circuit de rendu des résultats performant doit être systématiquement associée à la mise en place des tests de CV, particulièrement dans les zones décentralisées où les médecins prescripteurs et les patients peuvent être plus difficilement joignables.

Bibliographie

- Abecasis, A.B., van Laethem, K., and Theys, K. (2015). Lack of evidence for the selection of E138 mutations by first-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in patients infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Lond. Engl.* *29*, 987–988.
- Achhra, A.C., Mwasakifwa, G., Amin, J., and Boyd, M.A. (2016). Efficacy and safety of contemporary dual-drug antiretroviral regimens as first-line treatment or as a simplification strategy: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV*.
- Adamson, C.S., and Freed, E.O. (2010). Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res.* *85*, 119–141.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., and Meyer, R.B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2657–2660.
- Aghokeng, A.F., Mpoudi-Ngole, E., Chia, J.E., Edoul, E.M., Delaporte, E., and Peeters, M. (2011). High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 1635–1641.
- Aghokeng, A.F., Kouanfack, C., Eymard-Duvernay, S., Butel, C., Edoul, G.E., Laurent, C., Koulla-Shiro, S., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., and Peeters, M. (2013). Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon. *J. Int. AIDS Soc.* *16*.
- Aghokeng, A.F., Monleau, M., Eymard-Duvernay, S., Dagnra, A., Kania, D., Ngo-Giang-Huong, N., Toni, T.D., Touré-Kane, C., Truong, L.X.T., Delaporte, E., et al. (2014). Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly antiretroviral therapy and monitored with the World Health Organization public health approach in sub-saharan Africa and southeast Asia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *58*, 99–109.
- Aitken, S.C., Bronze, M., Wallis, C.L., Stuyver, L., Steegen, K., Balinda, S., Kityo, C., Stevens, W., Rinke de Wit, T.F., and Schuurman, R. (2013a). A Pragmatic Approach to HIV-1 Drug Resistance Determination in Resource-Limited Settings by Use of a Novel Genotyping Assay Targeting the Reverse Transcriptase-Encoding Region Only. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 1757–1761.
- Aitken, S.C., Kliphuis, A., Bronze, M., Wallis, C.L., Kityo, C., Balinda, S., Stevens, W., Spieker, N., de Oliveira, T., Rinke de Wit, T.F., et al. (2013b). Development and Evaluation of an Affordable Real-Time Qualitative Assay for Determining HIV-1 Virological Failure in Plasma and Dried Blood Spots. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 1899–1905.

- Aitken, S.C., Wallis, C.L., Stevens, W., de Wit, T.R., and Schuurman, R. (2015). Stability of HIV-1 Nucleic Acids in Dried Blood Spot Samples for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *PloS One* *10*, e0131541.
- Alidjinou, E.K., Bocket, L., and Hober, D. (2015). Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: A review of relevant clinical uses and laboratory methods. *Pathol. Biol. (Paris)* *63*, 53–59.
- Al-Soud, W.A., and Rådström, P. (2001). Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 485–493.
- Amendola, A., Bordi, L., Angeletti, C., Visco-Comandini, U., Abbate, I., Cappiello, G., Budabbus, M.A., Eljhawi, O.A., Mehabresh, M.I., Girardi, E., et al. (2002). Underevaluation of HIV-1 plasma viral load by a commercially available assay in a cluster of patients infected with HIV-1 A/G circulating recombinant form (CRF02). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *31*, 488–494.
- Amendola, A., Pisciotta, M., Aleo, L., Ferraioli, V., Angeletti, C., and Capobianchi, M.R. (2016). Evaluation of the Aptima® HIV-1 Quant Dx assay for HIV-1 RNA viral load detection and quantitation in plasma of HIV-1 infected individuals: A comparison with Abbott RealTime HIV-1 assay. *J. Med. Virol.*
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., and Parniak, M.A. (1998). 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.)* *37*, 15908–15917.
- Arredondo, M., Garrido, C., Parkin, N., Zahonero, N., Bertagnolio, S., Soriano, V., and de Mendoza, C. (2012). Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbott real-time viral load assay. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 569–572.
- Arribas, J.R., Girard, P.-M., Landman, R., Pich, J., Mallolas, J., Martínez-Rebollar, M., Zamora, F.X., Estrada, V., Crespo, M., Podzamczar, D., et al. (2015). Dual treatment with lopinavir–ritonavir plus lamivudine versus triple treatment with lopinavir–ritonavir plus lamivudine or emtricitabine and a second nucleos (t) ide reverse transcriptase inhibitor for maintenance of HIV-1 viral suppression (OLE): a randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet Infect. Dis.* *15*, 785–792.
- Arribas, J.R., Girard, P.-M., Paton, N., Winston, A., Marcelin, A.-G., Elbirt, D., Hill, A., and Hadacek, M.B. (2016). Efficacy of protease inhibitor monotherapy vs. triple therapy: meta-analysis of data from 2303 patients in 13 randomized trials. *HIV Med.* *17*, 358–367.
- Avettand-Fenoel, V., Damond, F., Gueudin, M., Matheron, S., Mélard, A., Collin, G., Descamps, D., Chaix, M.-L., Rouzioux, C., Plantier, J.-C., et al. (2014). New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 3017–3022.
- Ayouba, A., Akoua-Koffi, C., Calvignac-Spencer, S., Esteban, A., Locatelli, S., Li, H., Li, Y., Hahn, B.H., Delaporte, E., Leendertz, F.H., et al. (2013). Evidence for continuing

- cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS Lond. Engl.* 27, 2488–2491.
- Baeten, J.M., Kahle, E., Lingappa, J.R., Coombs, R.W., Delany-Moretlwe, S., Nakku-Joloba, E., Mugo, N.R., Wald, A., Corey, L., Donnell, D., et al. (2011). Genital HIV-1 RNA predicts risk of heterosexual HIV-1 transmission. *Sci. Transl. Med.* 3, 77ra29.
- Balinda, S.N., Ondo, P., Obuku, E.A., Kliphuis, A., Egau, I., Bronze, M., Kasambula, L., Schuurman, R., Spieker, N., Rinke de Wit, T.F., et al. (2016). Clinical Evaluation of an Affordable Qualitative Viral Failure Assay for HIV Using Dried Blood Spots in Uganda. *PloS One* 11, e0145110.
- Barenes, H., Virak, K., Rouet, F., Buisson, Y., Strobel, M., and Vibol, U. (2016). Factors associated with the failure of first and second-line antiretroviral therapies therapy, a case control study in Cambodian HIV-1 infected children. *BMC Res. Notes* 9, 69.
- Barré-Sinoussi, F. (2010). HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement. *Virology* 397, 255–259.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Barth, R.E., van der Loeff, M.F.S., Schuurman, R., Hoepelman, A.I., and Wensing, A.M. (2010). Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 10, 155–166.
- Bartlett, J.A., and Shao, J.F. (2009). Successes, challenges, and limitations of current antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries. *Lancet Infect. Dis.* 9, 637–649.
- Bernheimer, J.M., Patten, G., Makeleni, T., Mantangana, N., Dumile, N., Goemaere, E., and Cox, V. (2015). Paediatric HIV treatment failure: a silent epidemic. *J. Int. AIDS Soc.* 18, 20090.
- Beyrer, C., Birx, D.L., Bekker, L.-G., Barré-Sinoussi, F., Cahn, P., Dybul, M.R., Eholié, S.P., Kavanagh, M.M., Katabira, E.T., Lundgren, J.D., et al. (2015). The Vancouver Consensus: antiretroviral medicines, medical evidence, and political will. *Lancet Lond. Engl.* 386, 505–507.
- Billieux, A., Nakigozi, G., Newell, K., Chang, L.W., Quinn, T.C., Gray, R.H., Ndyababo, A., Galiwango, R., Kiggundu, V., Serwadda, D., et al. (2015). Durable Suppression of HIV-1 after Virologic Monitoring-Based Antiretroviral Adherence Counseling in Rakai, Uganda. *PLoS ONE* 10.
- Billong, S.C., Fokam, J., Aghokeng, A.F., Milenge, P., Kembou, E., Abessouguie, I., Meva'a-Onglene, F.B., Bissek, A.C.Z.-K., Colizzi, V., Mpoudi, E.N., et al. (2013). Population-based monitoring of emerging HIV-1 drug resistance on antiretroviral therapy and associated factors in a sentinel site in Cameroon: low levels of resistance but poor programmatic performance. *PloS One* 8, e72680.

- Bland, J.M., and Altman, D.G. (1995). Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *The Lancet* 346, 1085–1087.
- Bland, J.M., and Altman, D.G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135–160.
- Bobkov, A.F., Kazennova, E.V., Selimova, L.M., Khanina, T.A., Ryabov, G.S., Bobkova, M.R., Sukhanova, A.L., Kravchenko, A.V., Ladnaya, N.N., Weber, J.N., et al. (2004). Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol.* 74, 191–196.
- Boender, T.S., Sigaloff, K.C.E., McMahon, J.H., Kiertiburanakul, S., Jordan, M.R., Barcarolo, J., Ford, N., Wit, T.F.R. de, and Bertagnolio, S. (2015a). Long-term Virological Outcomes of First-Line Antiretroviral Therapy for HIV-1 in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1453–1461.
- Boender, T.S., Hoenderboom, B.M., Sigaloff, K.C.E., Hamers, R.L., Wellington, M., Shamu, T., Siwale, M., Maksimos, E.E.F.L., Nankya, I., Kityo, C.M., et al. (2015b). Pretreatment HIV Drug Resistance Increases Regimen Switches in Sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1749–1758.
- Boender, T.S., Kityo, C.M., Boerma, R.S., Hamers, R.L., Ondo, P., Wellington, M., Siwale, M., Nankya, I., Kaudha, E., Akanmu, A.S., et al. (2016a). Accumulation of HIV-1 drug resistance after continued virological failure on first-line ART in adults and children in sub-Saharan Africa. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Boender, T.S., Hamers, R.L., Ondo, P., Wellington, M., Chimbetete, C., Siwale, M., Labib Maksimos, E.E.F., Balinda, S.N., Kityo, C.M., Adeyemo, T.A., et al. (2016b). Protease Inhibitor Resistance in the First 3 Years of Second-Line Antiretroviral Therapy for HIV-1 in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.* 214, 873–883.
- Boillot, F., Serrano, L., Muwonga, J., Kabuayi, J.P., Kambale, A., Mutaka, F., Fujiwara, P.I., Decosas, J., Peeters, M., and Delaporte, E. (2016). Implementation and Operational Research: Programmatic Feasibility of Dried Blood Spots for the Virological Follow-up of Patients on Antiretroviral Treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 71, e9–e15.
- Bonner, K., Mezocho, A., Roberts, T., Ford, N., and Cohn, J. (2013). Viral load monitoring as a tool to reinforce adherence: a systematic review. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 64, 74–78.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Bor, J., Herbst, A.J., Newell, M.-L., and Bärnighausen, T. (2013). Increases in adult life expectancy in rural South Africa: valuing the scale-up of HIV treatment. *Science* 339, 961–965.
- Boullé, C., Kouanfack, C., Laborde-Balen, G., Boyer, S., Aghokeng, A.F., Carrieri, M.P., Kazé, S., Dontsop, M., Mben, J.-M., Koulla-Shiro, S., et al. (2015). Gender Differences in

- Adherence and Response to Antiretroviral Treatment in the Stratal Trial in Rural District Hospitals in Cameroon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 *69*, 355–364.
- Bourlet, T., Signori-Schmuck, A., Roche, L., Icard, V., Saoudin, H., Trabaud, M.-A., Tardy, J.-C., Morand, P., Pozzetto, B., Ecochard, R., et al. (2011). HIV-1 Load Comparison Using Four Commercial Real-Time Assays. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 292–297.
- Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev.* *3*, 469–478.
- Boyd, M.A., Moore, C.L., Molina, J.-M., Wood, R., Madero, J.S., Wolff, M., Ruxrungtham, K., Losso, M., Renjifo, B., Teppler, H., et al. (2015). Baseline HIV-1 resistance, virological outcomes, and emergent resistance in the SECOND-LINE trial: an exploratory analysis. *Lancet HIV* *2*, e42–e51.
- Boyer, S., Eboko, F., Camara, M., Abé, C., Nguini, M.E.O., Koulla-Shiro, S., and Moatti, J.-P. (2010). Scaling up access to antiretroviral treatment for HIV infection: the impact of decentralization of healthcare delivery in Cameroon. *AIDS Lond. Engl.* *24 Suppl 1*, S5-15.
- Braun, J., Plantier, J.-C., Hellot, M.-F., Tuailon, E., Gueudin, M., Damond, F., Malmsten, A., Corrigan, G.E., and Simon, F. (2003). A new quantitative HIV load assay based on plasma virion reverse transcriptase activity for the different types, groups and subtypes. *AIDS Lond. Engl.* *17*, 331–336.
- Brenner, S. (2014). Frederick Sanger (1918–2013). *Science* *343*, 262–262.
- Brenner, B.G., Oliveira, M., Doualla-Bell, F., Moisi, D.D., Ntemgwa, M., Frankel, F., Essex, M., and Wainberg, M.A. (2006). HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS Lond. Engl.* *20*, F9-13.
- Briggs, J.A.G., and Kräusslich, H.-G. (2011). The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* *410*, 491–500.
- Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Saimot, A.G., Rozenbaum, W., Christol, D., Gluckmann, J.C., Montagnier, L., and Chermann, J.C. (1984a). Detection of IgG antibodies to lymphadenopathy-associated virus in patients with AIDS or lymphadenopathy syndrome. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1253–1256.
- Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Montagnier, L., Chamaret, S., Gruet, J., Barre-Sinoussi, F., Geroldi, D., Chermann, J.C., McCormick, J., Mitchell, S., et al. (1984b). Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science* *226*, 453–456.
- Bunupuradah, T., Chetchotisakd, P., Ananworanich, J., Munsakul, W., Jirajariyavej, S., Kantipong, P., Prasithsirikul, W., Sungkanuparph, S., Bowonwatanuwong, C., Klinbuayaem, V., et al. (2012). A randomized comparison of second-line lopinavir/ritonavir monotherapy versus tenofovir/lamivudine/lopinavir/ritonavir in patients failing NNRTI regimens: the HIV STAR study. *Antivir. Ther.* *17*, 1351–1361.

- Bystryak, S., and Acharya, C. (2016). Detection of HIV-1 p24 antigen in patients with varying degrees of viremia using an ELISA with a photochemical signal amplification system. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 456, 128–136.
- Cahn, P., Pozniak, A.L., Mingrone, H., Shuldyakov, A., Brites, C., Andrade-Villanueva, J.F., Richmond, G., Buendia, C.B., Fourie, J., Ramgopal, M., et al. (2013). Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet Lond. Engl.* 382, 700–708.
- Cambiano, V., Bertagnolio, S., Jordan, M.R., Lundgren, J.D., and Phillips, A. (2013). Transmission of drug resistant HIV and its potential impact on mortality and treatment outcomes in resource-limited settings. *J. Infect. Dis.* 207 Suppl 2, S57-62.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D.D. (1995). Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 201–208.
- Carlson, J.M., Schaefer, M., Monaco, D.C., Batorsky, R., Claiborne, D.T., Prince, J., Deymier, M.J., Ende, Z.S., Klatt, N.R., DeZiel, C.E., et al. (2014). HIV transmission. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck. *Science* 345, 1254031.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science* 316, 1908–1912.
- Carr, J.K., Wolfe, N.D., Torimiro, J.N., Tamoufe, U., Mpoudi-Ngole, E., Eyzaguirre, L., Bix, D.L., McCutchan, F.E., and Burke, D.S. (2010). HIV-1 recombinants with multiple parental strains in low-prevalence, remote regions of Cameroon: evolutionary relics? *Retrovirology* 7, 39.
- Castagna, A., Maggiolo, F., Penco, G., Wright, D., Mills, A., Grossberg, R., Molina, J.-M., Chas, J., Durant, J., Moreno, S., et al. (2014). Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J. Infect. Dis.* 210, 354–362.
- Castro, H., Pillay, D., Cane, P., Asboe, D., Cambiano, V., Phillips, A., Dunn, D.T., and UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance (2013). Persistence of HIV-1 transmitted drug resistance mutations. *J. Infect. Dis.* 208, 1459–1463.
- Ceffa, S., Luhanga, R., Andreotti, M., Brambilla, D., Erba, F., Jere, H., Mancinelli, S., Giuliano, M., Palombi, L., and Marazzi, M.C. (2016). Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 real time molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. *J. Virol. Methods* 229, 35–39.
- Centers for Disease Control (CDC) (1981a). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 250–252.
- Centers for Disease Control (CDC) (1981b). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 305–308.

- Centers for Disease Control (CDC) (1982a). A cluster of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 305–307.
- Centers for Disease Control (CDC) (1982b). Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 652–654.
- Centers for Disease Control (CDC) (1982c). *Pneumocystis carinii* pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 365–367.
- Chaix, M.-L., Seng, R., Frange, P., Tran, L., Avettand-Fenoël, V., Ghosn, J., Reynes, J., Yazdanpanah, Y., Raffi, F., Goujard, C., et al. (2013). Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 56, 880–887.
- Charpentier, C., Eholié, S., Anglaret, X., Bertine, M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoël, V., Messou, E., Minga, A., Damond, F., Plantier, J.-C., et al. (2014). Genotypic resistance profiles of HIV-2-treated patients in West Africa. *AIDS Lond. Engl.* 28, 1161–1169.
- Charpentier, C., Camacho, R., Ruelle, J., Eberle, J., Gürtler, L., Pironi, A., Stürmer, M., Brun-Vézinet, F., Kaiser, R., Descamps, D., et al. (2015). HIV-2EU—Supporting Standardized HIV-2 Drug-Resistance Interpretation in Europe: An Update: Table 1. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1346–1347.
- Church, D., Gregson, D., Lloyd, T., Klein, M., Beckthold, B., Laupland, K., and Gill, M.J. (2011). Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J. Clin. Microbiol.* 49, 118–124.
- Ciaffi, L., Koulla-Shiro, S., Sawadogo, A., le Moing, V., Eymard-Duvernay, S., Izard, S., Kouanfack, C., Ngom Gueye, N.F., Fobang, A.A., Reynes, J., et al. (2015). Efficacy and safety of three second-line antiretroviral regimens in HIV-infected patients in Africa: *AIDS* 29, 1473–1481.
- Ciaffi, L., Koulla-Shiro, S., Sawadogo, A., Ngom, G., Le Moing, V., Eymard-Duvernay, S., Izard, S., Zoungrana, J., Mbouyap, P., Diallo, M., Bado, G., Toure Kane, K., Aghokeng, A., Peeters, M., Reynes, J., Delaporte, E. (2016). Dual therapy with a boosted protease inhibitor plus lamivudine is an effective maintenance strategy in patients on second line antiretroviral therapy in Africa: the ANRS 12286/MOBIDIP trial. HIV drug resistance therapy. Conference Glasgow 2016.
- Ciaranello, A.L., Park, J.-E., Ramirez-Avila, L., Freedberg, K.A., Walensky, R.P., and Leroy, V. (2011). Early infant HIV-1 diagnosis programs in resource-limited settings: opportunities for improved outcomes and more cost-effective interventions. *BMC Med.* 9, 59.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

- Clumeck, N., Sonnet, J., Taelman, H., Mascart-Lemone, F., De Bruyere, M., Vandepierre, P., Dasnoy, J., Marcelis, L., Lamy, M., and Jonas, C. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *N. Engl. J. Med.* *310*, 492–497.
- Coffin, J., and Swanstrom, R. (2013). HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., and Vogt, P. (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* *321*, 10.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. (1997). Taxonomy and Sequence Relatedness of Retroviruses (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Cohen, J. (2016). “Patient Zero” no more. *Science* *351*, 1013–1013.
- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., et al. (2011). Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* *365*, 493–505.
- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., et al. (2016). Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N. Engl. J. Med.* *375*, 830–839.
- Colebunders, R., Taelman, H., and Piot, P. (1984). AIDS: an old disease from Africa? *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* *289*, 765.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* *350*, 91–92.
- Connor, E.M., Sperling, R.S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O’Sullivan, M.J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., and Jacobson, R.L. (1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* *331*, 1173–1180.
- Coombs, R.W., Collier, A.C., Allain, J.-P., Nikora, B., Leuther, M., Gjerset, G.F., and Corey, L. (1989). Plasma Viremia in Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* *321*, 1626–1631.
- Coste, J., Montes, B., Reynes, J., Peeters, M., Segarra, C., Vendrell, J.P., Delaporte, E., and Segondy, M. (1996). Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Med. Virol.* *50*, 293–302.
- Coutsinos, D., Invernizzi, C.F., Xu, H., Moisi, D., Oliveira, M., Brenner, B.G., and Wainberg, M.A. (2009). Template usage is responsible for the preferential acquisition of the K65R reverse transcriptase mutation in subtype C variants of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *83*, 2029–2033.
- Cozzi-Lepri, A., Phillips, A.N., Martinez-Picado, J., Monforte, A. d’Arminio, Katlama, C., Eg Hansen, A.-B., Horban, A., Bruun, J., Clotet, B., Lundgren, J.D., et al. (2009). Rate of accumulation of thymidine analogue mutations in patients continuing to receive virologically failing regimens containing zidovudine or stavudine: implications for

- antiretroviral therapy programs in resource-limited settings. *J. Infect. Dis.* 200, 687–697.
- Craigie, R. (2012). The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol.* 7, 679–686.
- Dagnra, A.Y., Vidal, N., Mensah, A., Patassi, A., Aho, K., Salou, M., Monleau, M., Prince-David, M., Singo, A., Pitche, P., et al. (2011). High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lomé, Togo. *J. Int. AIDS Soc.* 14, 30.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767.
- Damond, F., Worobey, M., Campa, P., Farfara, I., Colin, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2004). Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 666–672.
- D'arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., et al. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1343-1352.
- Das, K., and Arnold, E. (2013). HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Curr. Opin. Virol.* 3, 111–118.
- Davies, M.-A., Boulle, A., Eley, B., Moultrie, H., Technau, K., Rabie, H., van Cutsem, G., Giddy, J., Wood, R., Egger, M., et al. (2011a). Accuracy of immunological criteria for identifying virological failure in children on antiretroviral therapy - the IeDEA Southern Africa Collaboration. *Trop. Med. Int. Health* 16, 1367–1371.
- Davies, M.-A., Moultrie, H., Eley, B., Rabie, H., Van Cutsem, G., Giddy, J., Wood, R., Technau, K., Keiser, O., Egger, M., et al. (2011b). Virologic failure and second-line antiretroviral therapy in children in South Africa - The IeDEA Southern Africa Collaboration. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 56, 270–278.
- De Baudrap, P., Thiam, M., Diouf, A., Toure-Kane, C., Ngom-Guèye, N.F., Vidal, N., Mboup, S., Ndoeye, I., Sow, P.S., Delaporte, E., et al. (2013). Risk of virological failure and drug resistance during first and second-line antiretroviral therapy in a 10-year cohort in Senegal: results from the ANRS 1215 cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 62, 381–387.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., and Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* 64, 1207–1216.
- De Luca, A., Dunn, D., Zazzi, M., Camacho, R., Torti, C., Fanti, I., Kaiser, R., Sönnernborg, A., Codoñer, F.M., Van Laethem, K., et al. (2013). Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in antiretroviral treatment-exposed individuals in Western Europe. *J. Infect. Dis.* 207, 1216–1220.

- Deeks, S.G., Martin, J.N., Sinclair, E., Harris, J., Neilands, T.B., Maecker, H.T., Hagos, E., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Brecht, B., et al. (2004). Strong cell-mediated immune responses are associated with the maintenance of low-level viremia in antiretroviral-treated individuals with drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* *189*, 312–321.
- Delarue, S., Didier, E., Damond, F., Ponscarne, D., Brengle-Pesce, K., Resche-Rigon, M., Vray, M., Gueudin, M., and Simon, F. (2013). Highly sensitive plasma RNA quantification by real-time PCR in HIV-2 group A and group B infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *58*, 461–467.
- Delaugerre, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.-C., and Simon, F. (2011). HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 1894.
- Delviks-Frankenberry, K.A., Lengrubler, R.B., Santos, A.F., Silveira, J.M., Soares, M.A., Kearney, M.F., Maldarelli, F., and Pathak, V.K. (2013). Connection subdomain mutations in HIV-1 subtype-C treatment-experienced patients enhance NRTI and NNRTI drug resistance. *Virology* *435*, 433–441.
- Desclaux, A., Ciss, M., Taverne, B., Sow, P.S., Egrot, M., Faye, M.A., Lanièce, I., Sylla, O., Delaporte, E., and Ndoeye, I. (2003). Access to antiretroviral drugs and AIDS management in Senegal. *AIDS Lond. Engl.* *17 Suppl 3*, S95-101.
- Desmonde, S., Eboua, F.T., Malateste, K., Dicko, F., Ekouévi, D.K., Ngbeché, S., Koueta, F., Sy, H.S., Renner, L., Koumakpai, S.A., et al. (2015). Determinants of durability of first-line antiretroviral therapy regimen and time from first-line failure to second-line antiretroviral therapy initiation. *AIDS Lond. Engl.* *29*, 1527–1536.
- van Deursen, P., Oosterlaken, T., Andre, P., Verhoeven, A., Bertens, L., Trabaud, M.A., Ligeon, V., and de Jong, J. (2010). Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *47*, 120–125.
- Dineva, M.A., Candotti, D., Fletcher-Brown, F., Allain, J.-P., and Lee, H. (2005). Simultaneous Visual Detection of Multiple Viral Amplicons by Dipstick Assay. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 4015–4021.
- Diouara, A.A.M., Ndiaye, H.D., Guindo, I., Bangoura, N., Cissé, M., Edmond, T., Bougoudogo, F., Mboup, S., Peeters, M., Ayouba, A., et al. (2014a). Antiretroviral treatment outcome in HIV-1-infected patients routinely followed up in capital cities and remote areas of Senegal, Mali and Guinea-Conakry. *J. Int. AIDS Soc.* *17*, 19315.
- Diouara, A.A.M., Diop-Ndiaye, H., Kebe-Fall, K., Tchiakpè, E., Ndiaye, O., Ayouba, A., Peeters, M., Mboup, S., and Kane, C.T. (2014b). Dried blood spots for HIV-1 drug resistance genotyping in decentralized settings in Senegal. *J. Med. Virol.* *86*, 45–51.
- Drexler, J.F., Reber, U., Wuttkopf, A., Eis-Hübinger, A.M., and Drosten, C. (2012). Performance of the novel Qiagen artus QS-RGQ viral load assays compared to that of the Abbott RealTime system with genetically diversified HIV and hepatitis C Virus plasma specimens. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 2114–2117.

- Drosten, C., Panning, M., Drexler, J.F., Hänsel, F., Pedroso, C., Yeats, J., de Souza Luna, L.K., Samuel, M., Liedigk, B., Lippert, U., et al. (2006). Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5' long terminal repeat domain. *Clin. Chem.* 52, 1258–1266.
- Ekouévi, D.K., Avettand-Fènoël, V., Tchounga, B.K., Coffie, P.A., Sawadogo, A., Minta, D., Minga, A., Eholie, S.P., Plantier, J.-C., Damond, F., et al. (2015). Plasma HIV-2 RNA According to CD4 Count Strata among HIV-2-Infected Adults in the IeDEA West Africa Collaboration. *PloS One* 10, e0129886.
- ENCORE1 Study Group, Puls, R., Amin, J., Losso, M., Phanuphak, P., Nwizu, C., Orrell, C., Young, B., Shahar, E., Wolff, M., et al. (2014). Efficacy of 400 mg efavirenz versus standard 600 mg dose in HIV-infected, antiretroviral-naive adults (ENCORE1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* 383, 1474–1482.
- ENCORE1 Study Group, Carey, D., Puls, R., Amin, J., Losso, M., Phanuphak, P., Foulkes, S., Mohapi, L., Crabtree-Ramirez, B., Jessen, H., et al. (2015). Efficacy and safety of efavirenz 400 mg daily versus 600 mg daily: 96-week data from the randomised, double-blind, placebo-controlled, non-inferiority ENCORE1 study. *Lancet Infect. Dis.* 15, 793–802.
- Erba, F., Brambilla, D., Ceffa, S., Ciccacci, F., Luhanga, R., Sidumo, Z., Palombi, L., Mancinelli, S., Marazzi, M.C., Andreotti, M., et al. (2015). Measurement of viral load by the automated Abbott real-time HIV-1 assay using dried blood spots collected and processed in Malawi and Mozambique. *South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneesk.* 105, 1036–1038.
- Eshleman, S.H., Hackett, J., Swanson, P., Cunningham, S.P., Drews, B., Brennan, C., Devare, S.G., Zekeng, L., Kaptué, L., and Marlowe, N. (2004). Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2711–2717.
- Estill, J., Egger, M., Blaser, N., Vizcaya, L.S., Garone, D., Wood, R., Campbell, J., Hallett, T.B., Keiser, O., and IeDEA Southern Africa (2013). Cost-effectiveness of point-of-care viral load monitoring of antiretroviral therapy in resource-limited settings: mathematical modelling study. *AIDS Lond. Engl.* 27, 1483–1492.
- Estill, J., Salazar-Vizcaya, L., Blaser, N., Egger, M., and Keiser, O. (2015). The cost-effectiveness of monitoring strategies for antiretroviral therapy of HIV infected patients in resource-limited settings: software tool. *PloS One* 10, e0119299.
- Etienne, L., Eymard-Duvernay, S., Aghokeng, A., Butel, C., Monleau, M., and Peeters, M. (2013). Single real-time reverse transcription-PCR assay for detection and quantification of genetically diverse HIV-1, SIVcpz, and SIVgor strains. *J. Clin. Microbiol.* 51, 787–798.
- Fajardo, E., Metcalf, C.A., Chaillet, P., Aleixo, L., Pannus, P., Panunzi, I., Triviño, L., Ellman, T., Likaka, A., and Mwenda, R. (2014). Prospective evaluation of diagnostic accuracy of dried blood spots from finger prick samples for determination of HIV-1 load with

- the NucliSENS Easy-Q HIV-1 version 2.0 assay in Malawi. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 1343–1351.
- Faria, N.R., Hodges-Mameletzis, I., Silva, J.C., Rodés, B., Erasmus, S., Paolucci, S., Ruelle, J., Pieniazek, D., Taveira, N., Treviño, A., et al. (2012). Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *J. Gen. Virol.* *93*, 889–899.
- Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pèpin, J., et al. (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* *346*, 56–61.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* *272*, 872–877.
- Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., and Schooley, R.T. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* *317*, 185–191.
- Fiscus, S.A., Cheng, B., Crowe, S.M., Demeter, L., Jennings, C., Miller, V., Respass, R., Stevens, W., and Forum for Collaborative HIV Research Alternative Viral Load Assay Working Group (2006). HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *PLoS Med.* *3*, e417.
- Fitzgerald, F., Penazzato, M., and Gibb, D. (2013). Development of antiretroviral resistance in children with HIV in low- and middle-income countries. *J. Infect. Dis.* *207 Suppl 2*, S85-92.
- Fofana, D.B., Soulie, C., Balde, A., Lambert-Niclot, S., Sylla, M., Ait-Arkoub, Z., Diallo, F., Sangare, B., Cisse, M., Maiga, I.A., et al. (2014). High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Fokam, J., Elat, J.-B.N., Billong, S.C., Kembou, E., Nkwescheu, A.S., Obam, N.M., Essiane, A., Torimiro, J.N., Ekanmian, G.K., Ndjolo, A., et al. (2015). Monitoring HIV Drug Resistance Early Warning Indicators in Cameroon: A Study Following the Revised World Health Organization Recommendations. *PloS One* *10*, e0129210.
- Ford, N., Shubber, Z., Pozniak, A., Vitoria, M., Doherty, M., Kirby, C., and Calmy, A. (2015a). Comparative Safety and Neuropsychiatric Adverse Events Associated With Efavirenz Use in First-Line Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 69*, 422–429.
- Ford, N., Stinson, K., Gale, H., Mills, E.J., Stevens, W., González, M.P., Markby, J., and Hill, A. (2015b). CD4 changes among virologically suppressed patients on antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *J. Int. AIDS Soc.* *18*.
- Ford, N., Meintjes, G., Pozniak, A., Bygrave, H., Hill, A., Peter, T., Davies, M.-A., Grinsztejn, B., Calmy, A., Kumarasamy, N., et al. (2015c). The future role of CD4 cell count for monitoring antiretroviral therapy. *Lancet Infect. Dis.* *15*, 241–247.

- Fourati, S., Charpentier, C., Amiel, C., Morand-Joubert, L., Reigadas, S., Trabaud, M.-A., Delaugerre, C., Nicot, F., Rodallec, A., Maillard, A., et al. (2015). Cross-resistance to elvitegravir and dolutegravir in 502 patients failing on raltegravir: a French national study of raltegravir-experienced HIV-1-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 1507–1512.
- Fox, M.P., Berhanu, R., Steegen, K., Firnhaber, C., Ive, P., Spencer, D., Mashamaite, S., Sheik, S., Jonker, I., Howell, P., et al. (2016). Intensive adherence counselling for HIV-infected individuals failing second-line antiretroviral therapy in Johannesburg, South Africa. *Trop. Med. Int. Health* *TM IH*.
- Frangé, P., Blanche, S., and Chaix, M.-L. (2014). [Pediatric HIV infections in developed countries: current situation and future challenges]. *Médecine Sci.* *MS* *30*, 551–557.
- Frangé, P., Assoumou, L., Descamps, D., Chéret, A., Goujard, C., Tran, L., Gousset, M., Avettand-Fenoël, V., Bocket, L., Fafi-Kremer, S., et al. (2015). HIV-1 subtype B-infected MSM may have driven the spread of transmitted resistant strains in France in 2007-12: impact on susceptibility to first-line strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 2084–2089.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 484–496.
- Frentz, D., van de Vijver, D., Abecasis, A., Albert, J., Hamouda, O., Jørgensen, L., Kücherer, C., Struck, D., Schmit, J.-C., Vercauteren, J., et al. (2014). Patterns of transmitted HIV drug resistance in Europe vary by risk group. *PloS One* *9*, e94495.
- Frost, S.D., Nijhuis, M., Schuurman, R., Boucher, C.A., and Brown, A.J. (2000). Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J. Virol.* *74*, 6262–6268.
- Gallant, J.E. (2006). The M184V mutation: what it does, how to prevent it, and what to do with it when it's there. *AIDS Read.* *16*, 556–559.
- Gallant, J.E., Koenig, E., Andrade-Villanueva, J., Chetchotisakd, P., DeJesus, E., Antunes, F., Arastéh, K., Moyle, G., Rizzardini, G., Fehr, J., et al. (2013). Cobicistat versus ritonavir as a pharmacoenhancer of atazanavir plus emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve HIV type 1-infected patients: week 48 results. *J. Infect. Dis.* *208*, 32–39.
- Gallant, J.E., Koenig, E., Andrade-Villanueva, J.F., Chetchotisakd, P., DeJesus, E., Antunes, F., Arastéh, K., Rizzardini, G., Fehr, J., Liu, H.C., et al. (2015). Brief Report: Cobicistat Compared With Ritonavir as a Pharmacoenhancer for Atazanavir in Combination With Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate: Week 144 Results. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *69*, 338–340.
- Gallant, J.E., Daar, E.S., Raffi, F., Brinson, C., Ruane, P., DeJesus, E., Johnson, M., Clumeck, N., Osiyemi, O., Ward, D., et al. (2016). Efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate given as fixed-dose combinations containing emtricitabine as backbones for treatment of HIV-1 infection in virologically suppressed adults: a randomised, double-blind, active-controlled phase 3 trial. *Lancet HIV* *3*, e158-165.

- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865–867.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436–441.
- Garcia-Diaz, A., Labbett, W., Clewley, G.S., Guerrero-Ramos, A., and Geretti, A.M. (2013). Comparative evaluation of the Artus HIV-1 QS-RGQ assay and the Abbott RealTime HIV-1 assay for the quantification of HIV-1 RNA in plasma. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 57, 66–69.
- Garforth, S.J., Lwatula, C., and Prasad, V.R. (2014). The lysine 65 residue in HIV-1 reverse transcriptase function and in nucleoside analog drug resistance. *Viruses* 6, 4080–4094.
- GBD 2015 HIV Collaborators, Wang, H., Wolock, T.M., Carter, A., Nguyen, G., Kyu, H.H., Gakidou, E., Hay, S.I., Mills, E.J., Trickey, A., et al. (2016). Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV* 3, e361–387.
- van Gemen, B., Kievits, T., Nara, P., Huisman, H.G., Jurriaans, S., Goudsmit, J., and Lens, P. (1993). Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification. *AIDS Lond. Engl.* 7 *Suppl 2*, S107–110.
- Geretti, A.M. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 1–7.
- Gilbert, M.T.P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T.J., Pitchenik, A.E., and Worobey, M. (2007). The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18566–18570.
- Gilks, C.F., Crowley, S., Ekpini, R., Gove, S., Perriens, J., Souteyrand, Y., Sutherland, D., Vitoria, M., Guerna, T., and De Cock, K. (2006). The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. *Lancet* 368, 505–510.
- Gilks, C.F., Walker, A.S., Munderi, P., Kityo, C., Reid, A., Katabira, E., Goodall, R.L., Grosskurth, H., Mugenyi, P., Hakim, J., et al. (2013). A Single CD4 Test with 250 Cells/Mm³ Threshold Predicts Viral Suppression in HIV-Infected Adults Failing First-Line Therapy by Clinical Criteria. *PLOS ONE* 8, e57580.
- Global fund, 2016. Viral load and early diagnosis selection and procurement information tool. <http://www.theglobalfund.org/en/procurement/viral-load-early-infant-diagnostics/> [accessed 03/02/16].
- Goldgur, Y., Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Craigie, R., and Davies, D.R. (1998). Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9150–9154.

- Gomes, P., Carvalho, A.P., Diogo, I., Gonçalves, F., Costa, I., Cabanas, J., and Camacho, R.J. (2013). Comparison of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0 with Abbott m2000rt RealTime HIV-1 assay for plasma RNA quantitation in different HIV-1 subtypes. *J. Virol. Methods* 193, 18–22.
- Goodsell, D.S. (2012). Illustrating the machinery of life: viruses. *Biochem. Mol. Biol. Educ. Bimon. Publ. Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 40, 291–296.
- Goodsell, D.S., Dutta, S., Zardecki, C., Voigt, M., Berman, H.M., and Burley, S.K. (2015). The RCSB PDB “Molecule of the Month”: Inspiring a Molecular View of Biology. *PLoS Biol.* 13, e1002140.
- Gopalakrishnan, S., Montazeri, H., Menz, S., Beerenwinkel, N., and Huisinga, W. (2014). Estimating HIV-1 fitness characteristics from cross-sectional genotype data. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003886.
- Gottlieb, M.S. (2006). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. *Am. J. Public Health* 96, 980-981-983.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305, 1425–1431.
- Granich, R., Kahn, J.G., Bennett, R., Holmes, C.B., Garg, N., Serenata, C., Sabin, M.L., Makhlof-Obermeyer, C., De Filippo Mack, C., Williams, P., et al. (2012). Expanding ART for treatment and prevention of HIV in South Africa: estimated cost and cost-effectiveness 2011-2050. *PloS One* 7, e30216.
- Grant, R.M., Kuritzkes, D.R., Johnson, V.A., Mellors, J.W., Sullivan, J.L., Swanstrom, R., D’Aquila, R.T., Van Gorder, M., Holodniy, M., Lloyd Jr, R.M., et al. (2003). Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1586–1593.
- Greengrass, V.L., Plate, M.M., Steele, P.M., Denholm, J.T., Cherry, C.L., Morris, L.M., Hearps, A., and Crowe, S.M. (2009). Evaluation of the Cavidix ExaVir Load assay (version 3) for plasma human immunodeficiency virus type 1 load monitoring. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3011–3013.
- Gueudin, M., Plantier, J.C., Lemée, V., Schmitt, M.P., Chartier, L., Bourlet, T., Ruffault, A., Damond, F., Vray, M., and Simon, F. (2007). Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 44, 500–505.
- Gueudin, M., Baron, A., Alessandri-Gradt, E., Lemée, V., Mourez, T., Etienne, M., and Plantier, J.C. (2016). Performance Evaluation of the new HIV-1 quantification assay, Xpert® HIV-1 Viral Load, on a wide panel of HIV-1 variants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999.
- Gueye, S.B., Diop-Ndiaye, H., Diallo, M.M., Ly, O., Sow-Ndoye, A., Diagne-Gueye, N.D., Kébé-Fall, K., Diop, F., Gaye-Diallo, A., Belec, L., et al. (2016). Performance of Roche CAP/CTM HIV-1 qualitative test version 2.0 using dried blood spots for early infant diagnosis. *J. Virol. Methods* 229, 12–15.

- Guichet, E., Aghokeng, A.F., Serrano, L., Bado, G., Toure-Kane, C., Eymard-Duvernay, S., Villabona-Arenas, C.-J., Delaporte, E., Ciaffi, L., and Peeters, M. (2016). High viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives in sub-Saharan Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* *59*, 307–321.
- Gupta, R.K., Jordan, M.R., Sultan, B.J., Hill, A., Davis, D.H.J., Gregson, J., Sawyer, A.W., Hamers, R.L., Ndembu, N., Pillay, D., et al. (2012). Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 1250–1258.
- Gupta, R.K., Goodall, R.L., Ranopa, M., Kityo, C., Munderi, P., Lyagoba, F., Mugarura, L., Gilks, C.F., Kaleebu, P., Pillay, D., et al. (2014). High Rate of HIV Resuppression After Viral Failure on First-line Antiretroviral Therapy in the Absence of Switch to Second-line Therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *58*, 1023–1026.
- Gupta, S., Palchaudhuri, R., Neogi, U., Srinivasa, H., Ashorn, P., De Costa, A., Källander, C., and Shet, A. (2016). Can HIV reverse transcriptase activity assay be a low-cost alternative for viral load monitoring in resource-limited settings? *BMJ Open* *6*, e008795.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* *326*, 662–669.
- Haas, A.D., Keiser, O., Balestre, E., Brown, S., Bissagnene, E., Chimbetete, C., Dabis, F., Davies, M.-A., Hoffmann, C.J., Oyaro, P., et al. (2015). Monitoring and switching of first-line antiretroviral therapy in adult treatment cohorts in sub-Saharan Africa: collaborative analysis. *Lancet HIV* *2*, e271–e278.
- Hamers, R.L., Sawyer, A.W., Tuohy, M., Stevens, W.S., Rinke de Wit, T.F., Hill, A.M., and ART-A Consortium (2012). Cost-effectiveness of laboratory monitoring for management of HIV treatment in sub-Saharan Africa: a model-based analysis. *AIDS Lond. Engl.* *26*, 1663–1672.
- Hamers, R.L., Sigaloff, K.C.E., Kityo, C., Mugenyi, P., and de Wit, T.F.R. (2013). Emerging HIV-1 drug resistance after roll-out of antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa: *Curr. Opin. HIV AIDS* *8*, 19–26.
- Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Deyton, L.R., et al. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N. Engl. J. Med.* *337*, 725–733.

- Hammond, R., and Harry, T.C. (2008). Efficacy of antiretroviral therapy in Africa: effect on immunological and virological outcome measures -- a meta-analysis. *Int. J. STD AIDS* 19, 291–296.
- Haregu, T.N., Oldenburg, B., Sestwe, G., Elliott, J., and Nanayakkara, V. (2012). Epidemiology of Comorbidity of HIV/AIDS and Non-communicable Diseases in Developing Countries: A systematic review. *J. Glob. Health Care Syst.* 2.
- Harrigan, R. (1995). Measuring viral load in the clinical setting. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 10 *Suppl 1*, S34-40.
- Harris, C., Small, C.B., Klein, R.S., Friedland, G.H., Moll, B., Emeson, E.E., Spigland, I., and Steigbigel, N.H. (1983). Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 308, 1181–1184.
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* 18, 182–192.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., and WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS Lond. Engl.* 25, 679–689.
- Hernando, V., Álvarez-del Arco, D., Alejos, B., Monge, S., Amato-Gauci, A.J., Noori, T., Pharris, A., and del Amo, J. (2015). HIV Infection in Migrant Populations in the European Union and European Economic Area in 2007-2012: An Epidemic on the Move. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 70, 204–211.
- Hertogs, K., de Béthune, M.P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., Van Cauwenberge, A., Van Den Eynde, C., Van Gerwen, V., Azijn, H., Van Houtte, M., et al. (1998). A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 269–276.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123–126.
- Hoffmann, C.J., Maritz, J., and van Zyl, G.U. (2016). CD4 count-based failure criteria combined with viral load monitoring may trigger worse switch decisions than viral load monitoring alone. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 21, 219–223.
- Hofstra, L.M., Sauvageot, N., Albert, J., Alexiev, I., Garcia, F., Struck, D., Van de Vijver, D.A.M.C., Åsjö, B., Beshkov, D., Coughlan, S., et al. (2016). Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 62, 655–663.

- Hogg, R.S., Anis, A., Weber, A.E., O'Shaughnessy, M.V., and Schechter, M.T. (1997). Triple-combination antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. *Lancet Lond. Engl.* *350*, 1406.
- Hopkins, M., Hau, S., Tiernan, C., Papadimitropoulos, A., Chawla, A., Beloukas, A., and Geretti, A.M. (2015). Comparative performance of the new Aptima HIV-1 Quant Dx assay with three commercial PCR-based HIV-1 RNA quantitation assays. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *69*, 56–62.
- Hosseinipour, M.C., Gupta, R.K., Van Zyl, G., Eron, J.J., and Nachega, J.B. (2013). Emergence of HIV drug resistance during first- and second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. *J. Infect. Dis.* *207 Suppl 2*, S49-56.
- Hsu, A., Granneman, G.R., and Bertz, R.J. (1998). Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents. *Clin. Pharmacokinet.* *35*, 275–291.
- Hu, Z., Giguel, F., Hatano, H., Reid, P., Lu, J., and Kuritzkes, D.R. (2006). Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *80*, 7020–7027.
- Hu, Z., Li, Z., Yang, Y., and Wei, H. (2015). Second-line Antiretroviral Treatment in Resource-Limited Settings: Abandon Lopinavir/Ritonavir Monotherapy or Search for New Candidates? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *61*, 852–853.
- Huang, A., Hogan, J.W., Luo, X., DeLong, A., Saravanan, S., Wu, Y., Sirivichayakul, S., Kumarasamy, N., Zhang, F., Phanuphak, P., et al. (2016). Global Comparison of Drug Resistance Mutations After First-Line Antiretroviral Therapy Across Human Immunodeficiency Virus-1 Subtypes. *Open Forum Infect. Dis.* *3*, ofv158.
- Hughes, J.P., Baeten, J.M., Lingappa, J.R., Magaret, A.S., Wald, A., de Bruyn, G., Kiarie, J., Inambao, M., Kilembe, W., Farquhar, C., et al. (2012). Determinants of Per-Coital-Act HIV-1 Infectivity Among African HIV-1–Serodiscordant Couples. *J. Infect. Dis.* *205*, 358–365.
- Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., et al. (2010). HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 54*, 241–247.
- Innes, S., Lazarus, E., Otworld, K., Liberty, A., Germanus, R., Van Rensburg, A.J., Grobbelaar, N., Hurter, T., Eley, B., Violari, A., et al. (2014). Early severe HIV disease precedes early antiretroviral therapy in infants: Are we too late? *J. Int. AIDS Soc.* *17*, 18914.
- INSIGHT START Study Group, Lundgren, J.D., Babiker, A.G., Gordin, F., Emery, S., Grund, B., Sharma, S., Avihingsanon, A., Cooper, D.A., Fätkenheuer, G., et al. (2015). Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N. Engl. J. Med.* *373*, 795–807.
- Invernizzi, C.F., Coutinos, D., Oliveira, M., Schildknecht, R.S., Xu, H., Gaseitsiwe, S., Moisi, D., Brenner, B.G., and Wainberg, M.A. (2013). The preferential selection of K65R in HIV-1 subtype C is attenuated by nucleotide polymorphisms at thymidine analogue mutation sites. *J. Antimicrob. Chemother.*

- Inzaule, S., Yang, C., Kasembeli, A., Nafisa, L., Okonji, J., Oyaro, B., Lando, R., Mills, L.A., Laserson, K., Thomas, T., et al. (2013). Field Evaluation of a Broadly Sensitive HIV-1 In-House Genotyping Assay for Use with both Plasma and Dried Blood Spot Specimens in a Resource-Limited Country. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 529–539.
- Inzaule, S.C., Ondo, P., Peter, T., Mugenyi, P.N., Stevens, W.S., de Wit, T.F.R., and Hamers, R.L. (2016a). Affordable HIV drug-resistance testing for monitoring of antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect. Dis.*
- Inzaule, S.C., Hamers, R.L., Zeh, C.E., and Rinke de Wit, T.F. (2016b). Stringent HIV Viral Load Threshold for Virological Failure Using Dried Blood Spots: Is the Perfect the Enemy of the Good? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 71*, e30-33.
- Iyidogan, P., and Anderson, K.S. (2014). Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses* *6*, 4095–4139.
- Jablonowski, H. (1995). Studies of zidovudine in combination with didanosine and zalcitabine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *10 Suppl 1*, S52-56.
- Jain, V., Sucupira, M.C., Bacchetti, P., Hartogensis, W., Diaz, R.S., Kallas, E.G., Janini, L.M., Liegler, T., Pilcher, C.D., Grant, R.M., et al. (2011). Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J. Infect. Dis.* *203*, 1174–1181.
- Jenabian, M.-A., Talla, F., Talla, P., Mbopi-Kéou, F.-X., Charpentier, C., Kane, C.T., and Bélec, L. (2015). Pitfalls of antiretroviral drug resistance genotyping of HIV-1 Group M and Group N from Cameroon by sequenced-based assays. *Niger. Med. J. J. Niger. Med. Assoc.* *56*, 420–424.
- Jespersen, S., Tolstrup, M., Hønge, B.L., Medina, C., Té, D. da S., Ellermann-Eriksen, S., Østergaard, L., Wejse, C., Laursen, A.L., and Bissau HIV cohort study group (2015). High level of HIV-1 drug resistance among patients with HIV-1 and HIV-1/2 dual infections in Guinea-Bissau. *Virology* *12*, 41.
- Jiamsakul, A., Sungkanuparph, S., Law, M., Kantor, R., Praparattanapan, J., Li, P.C.K., Phanuphak, P., Merati, T., Ratanasuwan, W., Lee, C.K.C., et al. (2014). HIV multi-drug resistance at first-line antiretroviral failure and subsequent virological response in Asia. *J. Int. AIDS Soc.* *17*, 19053.
- Jobanputra, K., Parker, L.A., Azih, C., Okello, V., Maphalala, G., Jouquet, G., Kerschberger, B., Mekeidje, C., Cyr, J., Mafikudze, A., et al. (2014). Impact and programmatic implications of routine viral load monitoring in Swaziland. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 67*, 45–51.
- Jonas, A., Sumbi, V., Mwinga, S., DeKlerk, M., Tjituka, F., Penney, S., Jordan, M.R., Desta, T., Tang, A.M., and Hong, S.Y. (2014). HIV drug resistance early warning indicators in namibia with updated World Health Organization guidance. *PloS One* *9*, e100539.
- Jonassen, T.O., Stene-Johansen, K., Berg, E.S., Hungnes, O., Lindboe, C.F., Frøland, S.S., and Grinde, B. (1997). Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* *231*, 43–47.

- Jordan, J.A., Plantier, J.C., Templeton, K., and Wu, A.H.B. (2016). Multi-site clinical evaluation of the Xpert® HIV-1 viral load assay. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *80*, 27–32.
- Jourdain, G., Le Cœur, S., Ngo-Giang-Huong, N., Traisathit, P., Cressey, T.R., Fregonese, F., Leurent, B., Collins, I.J., Techapornroong, M., Banchongkit, S., et al. (2013). Switching HIV treatment in adults based on CD4 count versus viral load monitoring: a randomized, non-inferiority trial in Thailand. *PLoS Med.* *10*, e1001494.
- Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M., and Bieniasz, P.D. (2006). Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* *4*, e435.
- Junqueira, D.M., and Almeida, S.E. de M. (2016). HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology* *495*, 173–184.
- Kalish, M.L., Robbins, K.E., Pieniazek, D., Schaefer, A., Nzilambi, N., Quinn, T.C., St. Louis, M.E., Youngpairaj, A.S., Phillips, J., Jaffe, H.W., et al. (2004). Recombinant Viruses and Early Global HIV-1 Epidemic. *Emerg. Infect. Dis.* *10*, 1227–1234.
- Kane, C.T., Ndiaye, H.D., Diallo, S., Ndiaye, I., Wade, A.S., Diaw, P.A., Gaye-Diallo, A., and Mboup, S. (2008). Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *J. Virol. Methods* *148*, 291–295.
- Kantor, R., Diero, L., Delong, A., Kamle, L., Muyonga, S., Mambo, F., Walumbe, E., Emonyi, W., Chan, P., Carter, E.J., et al. (2009). Misclassification of first-line antiretroviral treatment failure based on immunological monitoring of HIV infection in resource-limited settings. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *49*, 454–462.
- Karn, J., and Graeble, M.A. (1992). New insights into the mechanism of HIV-1 trans-activation. *Trends Genet. TIG* *8*, 365–368.
- Katlama, C., Soulié, C., Caby, F., Denis, A., Blanc, C., Schneider, L., Valantin, M.-A., Tubiana, R., Kirstetter, M., Valdenassi, E., et al. (2016). Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Kaur, P., Khong, W.X., Wee, S.Y., Tan, E.L., Pipper, J., Koay, E., Ng, K.Y., Yap, J.K., Chew, K.K., Tan, M.T., et al. (2014). Clinical evaluation of a low cost, in-house developed real-time RT-PCR human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) quantitation assay for HIV-1 infected patients. *PloS One* *9*, e89826.
- Kébé, K., Ndiaye, O., Ndiaye, H.D., Mengue, P.M., Guindo, P.M.M., Diallo, S., Léye, N., Gueye, S.B., Diallo, A.G., Kane, C.T., et al. (2011). RNA versus DNA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 versus Amplicor HIV-1 DNA test v1.5) for early diagnosis of HIV-1 infection in infants in Senegal. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 2590–2593.
- Kebe, K., Thiam, M., Diagne Gueye, N.R., Diop, H., Dia, A., Signate Sy, H., Charpentier, C., Belec, L., Mboup, S., and Toure Kane, C. (2012). High Rate Of Antiretroviral Drug Resistance Mutations in HIV Type 1-Infected Senegalese Children in Virological Failure on First-Line Treatment According to the World Health Organization Guidelines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *29*, 242–249.

- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523–526.
- Keiser, O., MacPhail, P., Boulle, A., Wood, R., Schechter, M., Dabis, F., Sprinz, E., Egger, M., and ART-LINC Collaboration of the International Databases to Evaluate AIDS (IeDEA) (2009). Accuracy of WHO CD4 cell count criteria for virological failure of antiretroviral therapy. *Trop. Med. Int. Health* 14, 1220–1225.
- Kellam, P., and Larder, B.A. (1994). Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 23–30.
- Kerschberger, B., Boulle, A.M., Kranzer, K., Hilderbrand, K., Schomaker, M., Coetzee, D., Goemaere, E., and Van Cutsem, G. (2015). Superior virologic and treatment outcomes when viral load is measured at 3 months compared to 6 months on antiretroviral therapy. *J. Int. AIDS Soc.* 18, 20092.
- Kestens, L., Hoofd, G., Gigase, P.L., Deleys, R., and van der Groen, G. (1991). HIV antigen detection in circulating immune complexes. *J. Virol. Methods* 31, 67–76.
- Kipp, W., Alibhai, A., Saunders, L.D., Senthilselvan, A., Kaler, A., Konde-Lule, J., Okech-Ojony, J., and Rubaale, T. (2010). Gender differences in antiretroviral treatment outcomes of HIV patients in rural Uganda. *AIDS Care* 22, 271–278.
- Kitayaporn, D., Tansuphaswadikul, S., Lohsomboon, P., Pannachet, K., Kaewkungwal, J., Limpakarnjanarat, K., and Mastro, T.D. (1996). Survival of AIDS patients in the emerging epidemic in Bangkok, Thailand. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 11, 77–82.
- Kluge, S.F., Mack, K., Iyer, S.S., Pujol, F.M., Heigele, A., Learn, G.H., Usmani, S.M., Sauter, D., Joas, S., Hotter, D., et al. (2014). Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe* 16, 639–650.
- Koethe, J.R., Westfall, A.O., Luhanga, D.K., Clark, G.M., Goldman, J.D., Mulenga, P.L., Cantrell, R.A., Chi, B.H., Zulu, I., Saag, M.S., et al. (2010). A cluster randomized trial of routine HIV-1 viral load monitoring in Zambia: study design, implementation, and baseline cohort characteristics. *PloS One* 5, e9680.
- Konou, A.A., Dagnra, A.Y., Vidal, N., Salou, M., Adam, Z., Singo-Tokofai, A., Delaporte, E., Prince-David, M., and Peeters, M. (2015a). Alarming rates of virological failure and drug resistance in patients on long-term antiretroviral treatment in routine HIV clinics in Togo. *AIDS Lond. Engl.* 29, 2527–2530.
- Konou, A.A., Salou, M., Vidal, N., Kodah, P., Kombate, D., Kpanla, P., Nabroulaba, T., Nyametso, D., Singo-Tokofai, A., Pitche, P., et al. (2015b). Virological outcome among HIV-1 infected patients on first-line antiretroviral treatment in semi-rural HIV clinics in Togo. *AIDS Res. Ther.* 12, 38.
- Kouanfack, C., Montavon, C., Laurent, C., Aghokeng, A., Kenfack, A., Bourgeois, A., Koulla-Shiro, S., Mpoudi-Ngole, E., Peeters, M., and Delaporte, E. (2009). Low Levels of Antiretroviral-Resistant HIV Infection in a Routine Clinic in Cameroon that Uses the

- World Health Organization (WHO) Public Health Approach to Monitor Antiretroviral Treatment and Adequacy with the WHO Recommendation for Second-Line Treatment. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1318–1322.
- Krebs, C. F., Hogan, H. T., Quiterio, S., Gartner, S., and Wigdahl, B. (2013) Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/WIGDAHL2001/Wigdahl1.html> [accessed 26/05/16]
- Kumarasamy, N., Aga, E., Ribaldo, H.J., Wallis, C.L., Katzenstein, D.A., Stevens, W.S., Norton, M.R., Klingman, K.L., Hosseinipour, M.C., Crump, J.A., et al. (2015). Lopinavir/Ritonavir Monotherapy as Second-line Antiretroviral Treatment in Resource-Limited Settings: Week 104 Analysis of AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5230. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 1552–1558.
- La Rosa, A.M., Harrison, L.J., Taiwo, B., Wallis, C.L., Zheng, L., Kim, P., Kumarasamy, N., Hosseinipour, M.C., Jarocki, B., Mellors, J.W., et al. (2016). Raltegravir in second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings (SELECT): a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet HIV* 3, e247-258.
- Labbett, W., Garcia-Diaz, A., Fox, Z., Clewley, G.S., Fernandez, T., Johnson, M., and Geretti, A.M. (2009). Comparative evaluation of the ExaVir Load version 3 reverse transcriptase assay for measurement of human immunodeficiency virus type 1 plasma load. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3266–3270.
- Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.
- Lalama, C.M., Jennings, C., Johnson, V.A., Coombs, R.W., McKinnon, J.E., Bremer, J.W., Cobb, B.R., Cloherty, G.A., Mellors, J.W., and Ribaldo, H.J. (2015). Comparison of Three Different FDA-Approved Plasma HIV-1 RNA Assay Platforms Confirms the Virologic Failure Endpoint of 200 Copies per Milliliter Despite Improved Assay Sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2659–2666.
- Lam, E.P., Moore, C.L., Gotuzzo, E., Nwizu, C., Kamarulzaman, A.B., Chetchotisakd, P., van Wyk, J., Teppler, H., Kumarasamy, N., Molina, J.-M., et al. (2016). Antiretroviral resistance following first-line antiretroviral therapy failure in diverse HIV-1 subtypes clades in the SECOND-LINE study. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.-F., and SEROCO-HEMOCO Study Group (2005). HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1053–1056.
- Laprise, C., Pokomandy, A. de, Baril, J.-G., Dufresne, S., and Trottier, H. (2013). Virologic Failure Following Persistent Low-level Viremia in a Cohort of HIV-Positive Patients: Results From 12 Years of Observation. *Clin. Infect. Dis.* 57, 1489–1496.
- Larder, B.A., and Kemp, S.D. (1989). Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246, 1155–1158.

- Lau, K.A., and Wong, J.J.L. (2013). Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infect. Dis. Rep.* 5, e4.
- Laurent, C., Diakhaté, N., Gueye, N.F.N., Touré, M.A., Sow, P.S., Faye, M.A., Gueye, M., Lanièce, I., Touré Kane, C., Liégeois, F., et al. (2002). The Senegalese government's highly active antiretroviral therapy initiative: an 18-month follow-up study. *AIDS Lond. Engl.* 16, 1363–1370.
- Laurent, C., Kouanfack, C., Koulla-Shiro, S., Nkoué, N., Bourgeois, A., Calmy, A., Lactuock, B., Nzeusseu, V., Mougnotou, R., Peytavin, G., et al. (2004). Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. *Lancet Lond. Engl.* 364, 29–34.
- Laurent, C., Kouanfack, C., Vergne, L., Tardy, M., Zekeng, L., Noumsi, N., Butel, C., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngolé, E., Koulla-Shiro, S., et al. (2006). Antiretroviral Drug Resistance and Routine Therapy, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1001–1004.
- Laurent, C., Kouanfack, C., Laborde-Balen, G., Aghokeng, A.F., Mbougua, J.B.T., Boyer, S., Carrieri, M.P., Mben, J.-M., Dontsop, M., Kazé, S., et al. (2011). Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Infect. Dis.* 11, 825–833.
- Lecher, S., Ellenberger, D., Kim, A.A., Fonjungo, P.N., Agolory, S., Borget, M.Y., Broyles, L., Carmona, S., Chipungu, G., De Cock, K.M., et al. (2015). Scale-up of HIV Viral Load Monitoring - Seven Sub-Saharan African Countries. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 1287–1290.
- Lee, H.H., Dineva, M.A., Chua, Y.L., Ritchie, A.V., Ushiro-Lumb, I., and Wisniewski, C.A. (2010). Simple amplification-based assay: a nucleic acid-based point-of-care platform for HIV-1 testing. *J. Infect. Dis.* 201 *Suppl 1*, S65-72.
- Leelawiwat, W., Young, N.L., Chaowanachan, T., Ou, C.Y., Culnane, M., Vanprapa, N., Waranawat, N., Wasinrapee, P., Mock, P.A., Tappero, J., et al. (2009). Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *J. Virol. Methods* 155, 109–117.
- Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., and Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6588–6592.
- Lessells, R.J., Avalos, A., and de Oliveira, T. (2013). Implementing HIV-1 Genotypic Resistance Testing in Antiretroviral Therapy Programs in Africa: Needs, Opportunities, and Challenges. *AIDS Rev.* 15, 221–229.
- Lessells, R.J., Stott, K.E., Manasa, J., Naidu, K.K., Skingsley, A., Rossouw, T., de Oliveira, T., and Southern African Treatment and Resistance Network (SATuRN) (2014). Implementing antiretroviral resistance testing in a primary health care HIV treatment programme in rural KwaZulu-Natal, South Africa: early experiences, achievements and challenges. *BMC Health Serv. Res.* 14, 116.

- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., and Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840–842.
- Li, P., Ruel, T., Fujimoto, K., Hatano, H., Yukl, S., Eller, L.A., Liegler, T., Kanya, M., Gassasira, A., Dorsey, G., et al. (2010). Novel application of Locked Nucleic Acid chemistry for a Taqman assay for measuring diverse human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J. Virol. Methods* 170, 115–120.
- Liégeois, F., Vella, C., Eymard-Duvernay, S., Sica, J., Makosso, L., Mouinga-Ondémé, A., Mongo, A.D., Boué, V., Butel, C., Peeters, M., et al. (2012). Virological failure rates and HIV-1 drug resistance patterns in patients on first-line antiretroviral treatment in semirural and rural Gabon. *J. Int. AIDS Soc.* 15, 17985.
- Locatelli, S., and Peeters, M. (2012). Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS Lond. Engl.* 26, 659–673.
- Lofgren, S.M., Morrissey, A.B., Chevallier, C.C., Malabeja, A.I., Edmonds, S., Amos, B., Sifuna, D.J., von Seidlein, L., Schimana, W., Stevens, W.S., et al. (2009). Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS Lond. Engl.* 23, 2459–2466.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., and Ray, S.C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- Loubet, P., Charpentier, C., Visseaux, B., Borbor, A., Nuta, C., Adu, E., Chapplain, J.-M., Baysah, M., Tattevin, P., Yazdanpanah, Y., et al. (2015). Prevalence of HIV-1 drug resistance among patients failing first-line ART in Monrovia, Liberia: a cross-sectional study. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1881–1884.
- Louis, J.M., Aniana, A., Weber, I.T., and Sayer, J.M. (2011). Inhibition of autoprocessing of natural variants and multidrug resistant mutant precursors of HIV-1 protease by clinical inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9072–9077.
- Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Simon, F., Brun-Vézinet, F., Ekwilanga, M., and Saragosti, S. (1995). Genetic diversity and HIV detection by polymerase chain reaction. *Lancet Lond. Engl.* 346, 912–913.
- Loutfy, M.R., Wu, W., Letchumanan, M., Bondy, L., Antoniou, T., Margolese, S., Zhang, Y., Rueda, S., McGee, F., Peck, R., et al. (2013). Systematic Review of HIV Transmission between Heterosexual Serodiscordant Couples where the HIV-Positive Partner Is Fully Suppressed on Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE* 8.
- Luft, L.M., Gill, M.J., and Church, D.L. (2011). HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 15, e661-670.
- Maartens, G., Celum, C., and Lewin, S.R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet Lond. Engl.* 384, 258–271.

- Mabey, D., Peeling, R.W., Ustianowski, A., and Perkins, M.D. (2004). Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 231–240.
- Maiers, T.J., Gous, N., Nduna, M., McFall, S.M., Kelso, D.M., Fisher, M.J., Palamountain, K.M., Scott, L.E., and Stevens, W.S. (2015). An investigation of fingerstick blood collection for point-of-care HIV-1 viral load monitoring in South Africa. *South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneeskd.* 105, 228–231.
- Maiga, A.I., Penugonda, S., Katile, D., Diallo, F., Fofana, D.B., Berzins, B., Maiga, M.Y., Sylla, A., Traore, H.A., Marcelin, A.-G., et al. (2012). Connection domain mutations during antiretroviral treatment failure in Mali: frequencies and impact on reverse transcriptase inhibitor activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 61, 293–296.
- Malmsten, A., Shao, X.-W., Sjö Dahl, S., Fredriksson, E.-L., Pettersson, I., Leitner, T., Källander, C.F.R., Sandström, E., and Gronowitz, J.S. (2005). Improved HIV-1 viral load determination based on reverse transcriptase activity recovered from human plasma. *J. Med. Virol.* 76, 291–296.
- Manasa, J., Danaviah, S., Pillay, S., Padayachee, P., Mthiyane, H., Mkhize, C., Lessells, R.J., Seebregts, C., de Wit, T.F.R., Viljoen, J., et al. (2014). An Affordable HIV-1 Drug Resistance Monitoring Method for Resource Limited Settings. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Manasa, J., Danaviah, S., Lessells, R.J., Elshareef, M., Tanser, F., Wilkinson, E., Pillay, S., Mthiyane, H., Mwambi, H., Pillay, D., et al. (2016). Increasing HIV-1 drug resistance between 2010 and 2012 in adults participating in population-based HIV surveillance in rural KwaZulu-Natal South Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*
- Mann, M., Lurie, M.N., Kimaiyo, S., and Kantor, R. (2013). Effects of political conflict-induced treatment interruptions on HIV drug resistance. *AIDS Rev.* 15, 15–24.
- Marcelin, A.-G., Delaugerre, C., Wirden, M., Viegas, P., Simon, A., Katlama, C., and Calvez, V. (2004). Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J. Med. Virol.* 72, 162–165.
- Marcelin, A.G., Charpentier, C., Wirden, M., Landman, R., Valantin, M.A., Simon, A., Katlama, C., Yeni, P., Descamps, D., Aubron-Olivier, C., et al. (2012). Resistance profiles of emtricitabine and lamivudine in tenofovir-containing regimens. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1475–1478.
- Marconi, A., Balestrieri, M., Comastri, G., Pulvirenti, F.R., Gennari, W., Tagliazucchi, S., Pecorari, M., Borghi, V., Marri, D., and Zazzi, M. (2009). Evaluation of the Abbott Real-Time HIV-1 quantitative assay with dried blood spot specimens. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 93–97.
- Margariti, A., Chatzidimitriou, D., Metallidis, S., Pilalas, D., Kourelis, A., Papadimitriou, E., Haidich, A.-B., Malisiovas, N., and Skoura, L. (2016). Comparing Abbott m2000 RealTime HIV test and Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV test, v2.0 in treated HIV-1 B and non-B subjects with low viraemia. *J. Med. Virol.* 88, 724–727.
- Margolis, D.A., Brinson, C.C., Smith, G.H.R., de Vente, J., Hagins, D.P., Eron, J.J., Griffith, S.K., St Clair, M.H., Stevens, M.C., Williams, P.E., et al. (2015). Cabotegravir plus

- rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (LATTE): a randomised, phase 2b, dose-ranging trial. *Lancet Infect. Dis.* *15*, 1145–1155.
- Margot, N.A., Liu, Y., Miller, M.D., and Callebaut, C. (2016). High resistance barrier to tenofovir alafenamide is driven by higher loading of tenofovir diphosphate into target cells compared to tenofovir disoproxil fumarate. *Antiviral Res.* *132*, 50–58.
- Mbida, A.D., Sosso, S., Flori, P., Saoudin, H., Lawrence, P., Monny-Lobé, M., Oyono, Y., Ndzi, E., Cappelli, G., Lucht, F., et al. (2009). Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *52*, 9–16.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* *272*, 1167–1170.
- de Mendoza, C., Koppelman, M., Montès, B., Ferre, V., Soriano, V., Cuypers, H., Segondy, M., and Oosterlaken, T. (2005). Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *J. Virol. Methods* *127*, 54–59.
- Menéndez-Arias, L. (2013). Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res.* *98*, 93–120.
- Mercier-Delarue, S., Vray, M., Plantier, J.C., Maillard, T., Adjout, Z., de Olivera, F., Schnepf, N., Maylin, S., Simon, F., and Delaugerre, C. (2014). Higher specificity of nucleic acid sequence-based amplification isothermal technology than of real-time PCR for quantification of HIV-1 RNA on dried blood spots. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 52–56.
- Mermin, J., Ekwaru, J.P., Were, W., Degerman, R., Bunnell, R., Kaharuzza, F., Downing, R., Coutinho, A., Solberg, P., Alexander, L.N., et al. (2011). Utility of routine viral load, CD4 cell count, and clinical monitoring among adults with HIV receiving antiretroviral therapy in Uganda: randomised trial. *BMJ* *343*, d6792.
- Messou, E., Chaix, M.-L., Gabillard, D., Yapo, V., Toni, T., Minga, A., Kouakou, M.G., Ouattara, E., Rouzioux, C., Danel, C., et al. (2013). Increasing rate of TAMs and etravirine resistance in HIV-1-infected adults between 12 and 24 months of treatment: the VOLTART cohort study in Côte d'Ivoire, West Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *64*, 211–219.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., So, A.G., and Scott, W.A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13471–13476.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., Mian, A.M., So, A.G., and Scott, W.A. (1999). A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell* *4*, 35–43.
- Mine, M., Nkoane, T., Sebetso, G., Sakyi, B., Makhaola, K., and Gaolathe, T. (2013). Validation of dilution of plasma samples with phosphate buffered saline to eliminate the problem of small volumes associated with children infected with HIV-1 for viral

- load testing using Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 test, version 2.0 (CAP CTM HIV v2.0). *J. Virol. Methods* 194, 217–221.
- Ministry of Public Health, 2004. Plan de décentralisation de la prise en charge par les antirétroviraux au Cameroun (2004-2005). Yaoundé, Cameroon, 2004.
- Ministry of Public Health, 2015. Directives nationales de prévention et de prise en charge du VIH au Cameroun, 2015.
- Molina, J.-M., Clotet, B., van Lunzen, J., Lazzarin, A., Cavassini, M., Henry, K., Kulagin, V., Givens, N., de Oliveira, C.F., Brennan, C., et al. (2015). Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir for treatment-naive adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 96 week results from a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet HIV* 2, e127-136.
- Mondi, A., Fabbiani, M., Ciccarelli, N., Colafigli, M., D'Avino, A., Borghetti, A., Gagliardini, R., Cauda, R., Luca, A.D., and Giambenedetto, S.D. (2015). Efficacy and safety of treatment simplification to atazanavir/ritonavir + lamivudine in HIV-infected patients with virological suppression: 144 week follow-up of the AtLaS pilot study. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1843–1849.
- Monleau, M., Montavon, C., Laurent, C., Segondy, M., Montes, B., Delaporte, E., Boillot, F., and Peeters, M. (2009). Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1107–1118.
- Monleau, M., Butel, C., Delaporte, E., Boillot, F., and Peeters, M. (2010). Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1562–1566.
- Monleau, M., Aghokeng, A.F., Nkano, B.A., Chaix, M.-L., Peeters, M., and AC11/AC12 ANRS Working Group (2012). Drug resistance mutations of HIV type 1 non-B viruses to integrase inhibitors in treatment-naive patients from sub-saharan countries and discordant interpretations. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 1157–1160.
- Monleau, M., Aghokeng, A.F., Eymard-Duvernay, S., Dagnra, A., Kania, D., Ngo-Giang-Huong, N., Touré-Kane, C., Truong, L.X.T., Chaix, M.-L., Delaporte, E., et al. (2014). Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. *J. Clin. Microbiol.* 52, 578–586.
- Mor, O., Gozlan, Y., Wax, M., Mileguir, F., Rakovsky, A., Noy, B., Mendelson, E., and Levy, I. (2015). Evaluation of the RealTime HIV-1, Xpert HIV-1, and Aptima HIV-1 Quant Dx Assays in Comparison to the NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 Assay for Quantification of HIV-1 Viral Load. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3458–3465.
- Morgan, D., Maude, G.H., Malamba, S.S., Okongo, M.J., Wagner, H.U., Mulder, D.W., and Whitworth, J.A. (1997). HIV-1 disease progression and AIDS-defining disorders in rural Uganda. *Lancet Lond. Engl.* 350, 245–250.

- Morlat, P., 2013 Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Recommandations du groupe d'experts. Rapport 2013. http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf [accessed 20/04/16]
- Morlat, P., 2015 Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Actualisation 2015 du rapport 2013. http://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2015/10/experts-vih_actualisation2015.pdf [accessed 20/04/16]
- Mosha, F., Muchunguzi, V., Matee, M., Sangeda, R.Z., Vercauteren, J., Nsubuga, P., Lyamuya, E., and Vandamme, A.-M. (2013). Gender differences in HIV disease progression and treatment outcomes among HIV patients one year after starting antiretroviral treatment (ART) in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Public Health* 13, 38.
- Mouafo, L.C.M., Péré, H., Ndjoyi-Mbiguino, A., Koyalta, D., Longo, J.D.D., Mbopi-Kéou, F.-X., Kane, C.T., and Bélec, L. (2015). LETTER TO THE EDITOR Performance of the ViroSeq® HIV-1 Genotyping System v2.0 in Central Africa. *Open AIDS J.* 9, 9–13.
- Mouinga-Ondémé, A., Mabika-Mabika, A., Alalade, P., Mongo, A.D., Sica, J., Liégeois, F., and Rouet, F. (2014). Significant impact of non-B HIV-1 variants genetic diversity in Gabon on plasma HIV-1 RNA quantitation. *J. Med. Virol.* 86, 52–57.
- Mourad, R., Chevennet, F., Dunn, D.T., Fearnhill, E., Delpech, V., Asboe, D., Gascuel, O., Hue, S., and UK HIV Drug Resistance Database & the Collaborative HIV, Anti-HIV Drug Resistance Network (2015). A phylogeny-based analysis highlights the role of drug-naïve HIV-positive individuals in the transmission of antiretroviral resistance in the UK. *AIDS Lond. Engl.* 29, 1917–1925.
- Mourez, T., Delaugerre, C., Vray, M., Lemée, V., Simon, F., and Plantier, J.-C. (2015). Comparison of the bioMérieux NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0-HIV-1 RNA quantification assay versus Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 on current epidemic HIV-1 variants. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 71, 76–81.
- Muenchhoff, M., Madurai, S., Hempenstall, A.J., Adland, E., Carlqvist, A., Moonsamy, A., Jaggernath, M., Mlotshwa, B., Siboto, E., Ndung'u, T., et al. (2014). Evaluation of the NucliSens EasyQ v2.0 assay in comparison with the Roche Amplicor v1.5 and the Roche CAP/CTM HIV-1 Test v2.0 in quantification of C-clade HIV-1 in plasma. *PLoS One* 9, e103983.
- Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., and Kwok, S. (1994). Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* 32, 292–300.
- Muniz, C.P., Soares, M.A., and Santos, A.F. (2014). Early selection of resistance-associated mutations in HIV-1 RT C-terminal domains across different subtypes: role of the genetic barrier to resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2741–2745.
- Mutagoma, M., Ndahimana, J., d'Amour, Kayirangwa, E., Dahourou, A.G., Balisanga, H., DeVos, J.R., McAlister, D., Yang, C., Bertagnolio, S., Riedel, D.J., et al. (2015).

- Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance among young adults attending HIV counselling and testing clinics in Kigali, Rwanda. *Antivir. Ther.*
- Muwonga, J., Edidi, S., Butel, C., Vidal, N., Monleau, M., Okenge, A., Mandjo, J.L., Mukumbi, H., Muyembe, J.J., Mbayo, F., et al. (2011). Resistance to Antiretroviral Drugs in Treated and Drug-Naive Patients in the Democratic Republic of Congo: *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *57*, S27–S33.
- Msellati, P., Vidal, L., et Moatti JP. (2001). L'accès aux traitements du VIH/SIDA en Côte d'Ivoire. Evaluation de l'Initiative ONUSIDA/Ministère de la Santé Publique. Aspects économiques, sociaux et comportementaux. Collection Sciences Sociales et SIDA, ANRS Paris. 327p.
- MSF, 2013. Issue brief : how low can we go ? Pricing for HIV viral load testing in low- and middle-income countries. <http://www.msfacecess.org/content/issue-brief-how-low-can-we-go> [accessed 12/02/16].
- MSF, 2016. Rapport le prix de l'oubli: des millions de personnes en Afrique occidentale et centrale restent en marge de la lutte mondiale contre le VIH. <http://www.msf.fr/actualite/publications/rapport-prix-oubli-millions-personnes-en-afrique-occidentale-et-centrale-rest> [accessed 28/04/16].
- Nair, S.V., Kim, H.C., Fortunko, J., Foote, T., Peling, T., Tran, C., Nugent, C.T., Joo, S., Kang, Y., Wilkins, B., et al. (2016). Aptima HIV-1 Quant Dx-A fully automated assay for both diagnosis and quantification of HIV-1. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *77*, 46–54.
- Napierala Mavedzenge, S., Davey, C., Chirenje, T., Mushati, P., Mtetwa, S., Dirawo, J., Mudenge, B., Phillips, A., and Cowan, F.M. (2015). Finger Prick Dried Blood Spots for HIV Viral Load Measurement in Field Conditions in Zimbabwe. *PloS One* *10*, e0126878.
- Ndahimana, J. d'Amour, Riedel, D.J., Muhayimpundu, R., Nsanzimana, S., Niyibizi, G., Mutaganzwa, E., Mulindabigwi, A., Baribwira, C., Kiromera, A., Jagodzinski, L.L., et al. (2016). HIV drug resistance mutations among patients failing second-line antiretroviral therapy in Rwanda. *Antivir. Ther.* *21*, 253–259.
- Ndiaye, O., Diop-Ndiaye, H., Ouedraogo, A.S., Fall-Malick, F.Z., Sow-Sall, A., Thiam, M., Diouara, A.A.M., Ndour, C.T., Gaye-Diallo, A., Mboup, S., et al. (2015). Comparison of four commercial viral load techniques in an area of non-B HIV-1 subtypes circulation. *J. Virol. Methods* *222*, 122–131.
- Neel, C., Etienne, L., Li, Y., Takehisa, J., Rudicell, R.S., Bass, I.N., Moudindo, J., Mebenga, A., Esteban, A., Heuverswyn, F.V., et al. (2010). Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Gorillas. *J. Virol.* *84*, 1464–1476.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* *451*, 425–430.
- Nelson, M.R., Elion, R.A., Cohen, C.J., Mills, A., Hodder, S.L., Segal-Maurer, S., Bloch, M., Garner, W., Guyer, B., Williams, S., et al. (2013). Rilpivirine versus efavirenz in HIV-

- 1-infected subjects receiving emtricitabine/tenofovir DF: pooled 96-week data from ECHO and THRIVE Studies. *HIV Clin. Trials* 14, 81–91.
- Neogi, U., Gupta, S., Rodridges, R., Sahoo, P.N., Rao, S.D., Rewari, B.B., Shastri, S., De Costa, A., and Shet, A. (2012). Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: A useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India. *Indian J. Med. Res.* 136, 956–962.
- Niama, F.R., Toure-Kane, C., Vidal, N., Obengui, P., Bikandou, B., Ndoundou Nkodia, M.Y., Montavon, C., Diop-Ndiaye, H., Mombouli, J.V., Mokondzimobe, E., et al. (2006). HIV-1 subtypes and recombinants in the Republic of Congo. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 6, 337–343.
- Nijhuis, M., Deeks, S., and Boucher, C. (2001). Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 23–28.
- Nkenfou, C.N., Lobé, E.E., Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, O., Sosso, M.S., Dambaya, B., Gwom, L.-C., Moyo, S.T., Tangimpundu, C., Ambada, G., Fainguem, N., et al. (2012). Implementation of HIV early infant diagnosis and HIV type 1 RNA viral load determination on dried blood spots in Cameroon: challenges and propositions. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 176–181.
- Nsanzimana, S., Prabhu, K., McDermott, H., Karita, E., Forrest, J.I., Drobac, P., Farmer, P., Mills, E.J., and Binagwaho, A. (2015). Improving health outcomes through concurrent HIV program scale-up and health system development in Rwanda: 20 years of experience. *BMC Med.* 13.
- Okoboi, S., Ekwaru, P.J., Campbell, J.D., Egessa, A., King, R., Bakanda, C., Muramuzi, E., Kaharuzza, F., Malamba, S., and Moore, D.M. (2016). No differences in clinical outcomes with the addition of viral load testing to CD4 cell count monitoring among HIV infected participants receiving ART in rural Uganda: Long-term results from the Home Based AIDS Care Project. *BMC Public Health* 16, 101.
- OMS, 2012. Rapport OMS 2012 sur la résistance du VIH aux antirétroviraux. <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/report2012/fr/> [consulté le 17/12/2015].
- OMS, 2014a. Surveillance de la résistance du VIH aux antirétroviraux chez les adultes qui commencent un traitement antirétroviral. Document analytique (résistance du VIH aux antirétroviraux acquise) http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/acquired_drugresistance/fr/ [consulté le 17/12/2015].
- OMS, 2014b. Surveillance de la résistance du VIH aux antirétroviraux chez les adultes qui commencent un traitement antirétroviral. Document analytique (résistance du VIH aux ARV prétraitement) http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/pretreatment_drugresistance/fr/ [consulté le 17/12/2015].
- Onafuwa-Nuga, A., and Telesnitsky, A. (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 73, 451–480, Table of Contents.

- ONUSIDA, 2015. Le traitement du VIH en Afrique : une crise imminente. http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2015/2015_HIVtreatmentinAfrica [consulté le 03/04/16].
- van Oosterhout, J.J.G., Brown, L., Weigel, R., Kumwenda, J.J., Mzinganjira, D., Saukila, N., Mhango, B., Hartung, T., Phiri, S., and Hosseinipour, M.C. (2009). Diagnosis of antiretroviral therapy failure in Malawi: poor performance of clinical and immunological WHO criteria. *Trop. Med. Int. Health TM IH 14*, 856–861.
- Ouattara, E.N., Robine, M., Eholié, S.P., MacLean, R.L., Moh, R., Losina, E., Gabillard, D., Paltiel, A.D., Danel, C., Walensky, R.P., et al. (2016). Laboratory Monitoring of Antiretroviral Therapy for HIV Infection: Cost-Effectiveness and Budget Impact of Current and Novel Strategies. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*
- Pachl, C., Todd, J.A., Kern, D.G., Sheridan, P.J., Fong, S.J., Stempien, M., Hoo, B., Besemer, D., Yeghiazarian, T., and Irvine, B. (1995). Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc. 8*, 446–454.
- Padaki, P.A., Sachithanandham, J., Isaac, R., Ramalingam, V.V., Abraham, O.C., Pulimood, S.A., and Kannangai, R. (2015). The performance of reverse transcriptase assay for the estimation of the plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 infections. *Infect. Dis. Lond. Engl. 1–5*.
- Pai, N.P., Wilkinson, S., Deli-Houssein, R., Vijh, R., Vadnais, C., Behlim, T., Steben, M., Engel, N., and Wong, T. (2015). Barriers to Implementation of Rapid and Point-of-Care Tests for Human Immunodeficiency Virus Infection: Findings From a Systematic Review (1996-2014). *Point Care 14*, 81–87.
- Palella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med. 338*, 853–860.
- Pandrea, I., Robertson, D.L., Onanga, R., Gao, F., Makuwa, M., Ngari, P., Bedjabaga, I., Roques, P., Simon, F., and Apetrei, C. (2002). Analysis of partial pol and env sequences indicates a high prevalence of HIV type 1 recombinant strains circulating in Gabon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses 18*, 1103–1116.
- Parkin, N.T. (2014). Measurement of HIV-1 viral load for drug resistance surveillance using dried blood spots: literature review and modeling of contribution of DNA and RNA. *AIDS Rev. 16*, 160–171.
- Parkin, N., de Mendoza, C., Schuurman, R., Jennings, C., Bremer, J., Jordan, M.R., Bertagnolio, S., and WHO DBS Genotyping Working Group (2012). Evaluation of in-house genotyping assay performance using dried blood spot specimens in the Global World Health Organization laboratory network. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 54 Suppl 4*, S273-279.
- Parry, C.M., Parkin, N., Diallo, K., Mwebaza, S., Batamwita, R., DeVos, J., Bbosa, N., Lyagoba, F., Magambo, B., Jordan, M.R., et al. (2014). Field Study of Dried Blood Spot Specimens for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *J. Clin. Microbiol.*

- Pasternak, A.O., Lukashov, V.V., and Berkhout, B. (2013). Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 10, 41.
- Paton, N.I., Kityo, C., Hoppe, A., Reid, A., Kambugu, A., Lugemwa, A., van Oosterhout, J.J., Kiconco, M., Siika, A., Mwebaze, R., et al. (2014). Assessment of second-line antiretroviral regimens for HIV therapy in Africa. *N. Engl. J. Med.* 371, 234–247.
- Paton, N., Kityo, C., Thompson, J., Bagenda, L., Hakim, J., van Oosterhout, Joep., Kambugu, A., Hoppe, A., Walker, S. (2015). Impact of NRTI cross-resistance on second-line PI+NRTI therapy outcomes in Africa. . Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Seattle, USA. Abstract 119.
- Peeters, M., Aghokeng, A.F., and Delaporte, E. (2010). Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 1525–1531.
- Peeters, M., Jung, M., and Ayouba, A. (2013). The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 885–896.
- Peeters, M., D’Arc, M., and Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev.* 16, 23–34.
- Pépin, J., 2011. The origins of AIDS. Cambridge University Press.
- Penot, P., Héma, A., Bado, G., Kaboré, F., Soré, I., Sombié, D., Traoré, J.-R., Guiard-Schmid, J.-B., Fontanet, A., Slama, L., et al. (2014). The vulnerability of men to virologic failure during antiretroviral therapy in a public routine clinic in Burkina Faso. *J. Int. AIDS Soc.* 17, 18646.
- Penrose, K.J., Parikh, U.M., Hamanishi, K.A., Else, L., Back, D., Boffito, M., Jackson, A., and Mellors, J.W. (2016). Selection of Rilpivirine-Resistant HIV-1 in a Seroconverter From the SSAT 040 Trial Who Received the 300-mg Dose of Long-Acting Rilpivirine (TMC278LA). *J. Infect. Dis.* 213, 1013–1017.
- Péré, H., Charpentier, C., Mbelesso, P., Dandy, M., Matta, M., Moussa, S., De Dieu Longo, J., Grésenguet, G., Abraham, B., and Bélec, L. (2012). Virological response and resistance profiles after 24 months of first-line antiretroviral treatment in adults living in Bangui, Central African Republic. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 315–323.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., and Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582–1586.
- Perez-Molina, J.A., Rubio, R., Rivero, A., Pasquau, J., Suárez-Lozano, I., Riera, M., Estébanez, M., Santos, J., Sanz-Moreno, J., Troya, J., et al. (2015). Dual treatment with atazanavir-ritonavir plus lamivudine versus triple treatment with atazanavir-ritonavir plus two nucleos(t)ides in virologically stable patients with HIV-1 (SALT): 48 week results from a randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet Infect. Dis.* 15, 775–784.

- Pham, Q.D., Wilson, D.P., Law, M.G., Kelleher, A.D., and Zhang, L. (2014). Global burden of transmitted HIV drug resistance and HIV-exposure categories: a systematic review and meta-analysis. *AIDS Lond. Engl.* 28, 2751–2762.
- Pincock, S. (2008). Françoise Barré-Sinoussi: shares Nobel Prize for discovery of HIV. *Lancet Lond. Engl.* 372, 1377.
- Pingen, M., Nijhuis, M., Bruijn, J.A. de, Boucher, C.A.B., and Wensing, A.M.J. (2011). Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1467–1480.
- Pingen, M., Wensing, A.M.J., Fransen, K., De Bel, A., de Jong, D., Hoepelman, A.I.M., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Lunar, M.M., Poljak, M., et al. (2014a). Persistence of frequently transmitted drug-resistant HIV-1 variants can be explained by high viral replication capacity. *Retrovirology* 11, 105.
- Pingen, M., Sarrami-Forooshani, R., Wensing, A.M.J., van Ham, P., Drewniak, A., Boucher, C.A.B., Geijtenbeek, T.B.H., and Nijhuis, M. (2014b). Diminished transmission of drug resistant HIV-1 variants with reduced replication capacity in a human transmission model. *Retrovirology* 11, 113.
- Piot, P., Quinn, T.C., Taelman, H., Feinsod, F.M., Minlangu, K.B., Wobin, O., Mbendi, N., Mazebo, P., Ndangi, K., and Stevens, W. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet Lond. Engl.* 2, 65–69.
- Piot, P., Abdool Karim, S.S., Hecht, R., Legido-Quigley, H., Buse, K., Stover, J., Resch, S., Ryckman, T., Møgedal, S., Dybul, M., et al. (2015). Defeating AIDS—advancing global health. *The Lancet* 386, 171–218.
- Pitchenik, A.E., Fischl, M.A., Dickinson, G.M., Becker, D.M., Fournier, A.M., O’Connell, M.T., Colton, R.M., and Spira, T.J. (1983). Opportunistic infections and Kaposi’s sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. *Ann. Intern. Med.* 98, 277–284.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872.
- Poveda, E., Briz, V., and Soriano, V. (2005). Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev.* 7, 139–147.
- Preiser, W., Drexler, J.F., and Drosten, C. (2006). HIV-1 viral load assays for resource-limited settings: clades matter. *PLoS Med.* 3, e538; author reply e550.
- Pujades-Rodríguez, M., Balkan, S., Arnould, L., Brinkhof, M.A.W., Calmy, A., and AIDS Working Group of MSF (2010). Treatment failure and mortality factors in patients receiving second-line HIV therapy in resource-limited countries. *JAMA* 304, 303–312.
- Quinn, T.C., Mann, J.M., Curran, J.W., and Piot, P. (1986). AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm. *Science* 234, 955–963.

- Quinn, T.C., Wawer, M.J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.O., Lutalo, T., and Gray, R.H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N. Engl. J. Med.* *342*, 921–929.
- Raffi, F., Jaeger, H., Quiros-Roldan, E., Albrecht, H., Belonosova, E., Gatell, J.M., Baril, J.-G., Domingo, P., Brennan, C., Almond, S., et al. (2013). Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect. Dis.* *13*, 927–935.
- Ragni, M.V., Urbach, A.H., Kiernan, S., Stambouli, J., Cohen, B., Rabin, B.S., Winkelstein, A., Gartner, J.C., Zitelli, B.Z., and Malatack, J.J. (1985). Acquired immunodeficiency syndrome in the child of a haemophiliac. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 133–135.
- Raja, S., Ching, J., Xi, L., Hughes, S.J., Chang, R., Wong, W., McMillan, W., Gooding, W.E., McCarty, K.S., Chestney, M., et al. (2005). Technology for automated, rapid, and quantitative PCR or reverse transcription-PCR clinical testing. *Clin. Chem.* *51*, 882–890.
- Rambaut, A., Robertson, D.L., Pybus, O.G., Peeters, M., and Holmes, E.C. (2001). Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* *410*, 1047–1048.
- Raugi, D.N., Smith, R.A., Gottlieb, G.S., and Group, for the U. of W.-D.H.-2 S. (2016). Four Amino Acid Changes in HIV-2 Protease Confer Class-Wide Sensitivity to Protease Inhibitors. *J. Virol.* *90*, 1062–1069.
- Rawizza, H.E., Chaplin, B., Meloni, S.T., Eisen, G., Rao, T., Sankale, J.-L., Dieng-Sarr, A., Agbaji, O., Onwujekwe, D.I., Gashau, W., et al. (2011). Immunologic Criteria Are Poor Predictors of Virologic Outcome: Implications for HIV Treatment Monitoring in Resource-Limited Settings. *Clin. Infect. Dis.* *53*, 1283–1290.
- Ray, A.S., Fordyce, M.W., and Hitchcock, M.J.M. (2016). Tenofovir alafenamide: A novel prodrug of tenofovir for the treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res.* *125*, 63–70.
- Redhead, S.A., Cushion, M.T., Frenkel, J.K., and Stringer, J.R. (2006). Pneumocystis and Trypanosoma cruzi: nomenclature and typifications. *J. Eukaryot. Microbiol.* *53*, 2–11.
- Reigadas, S., Schrive, M.H., Aurillac-Lavignolle, V., and Fleury, H.J. (2009). Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *J. Virol. Methods* *161*, 177–180.
- Ren, J., Bird, L.E., Chamberlain, P.P., Stewart-Jones, G.B., Stuart, D.I., and Stammers, D.K. (2002). Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14410–14415.
- Reynolds, S.J., Sendagire, H., Newell, K., Castelnuovo, B., Nankya, I., Kanya, M., Quinn, T.C., Manabe, Y.C., and Kambugu, A. (2012). Virologic versus immunologic monitoring and the rate of accumulated genotypic resistance to first-line antiretroviral drugs in Uganda. *BMC Infect. Dis.* *12*, 381.

- Rhee, S.-Y., Blanco, J.L., Jordan, M.R., Taylor, J., Lemey, P., Varghese, V., Hamers, R.L., Bertagnolio, S., Rinke de Wit, T.F., Aghokeng, A.F., et al. (2015a). Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med.* *12*, e1001810.
- Rhee, S.-Y., Jordan, M.R., Raizes, E., Chua, A., Parkin, N., Kantor, R., Van Zyl, G.U., Mukui, I., Hosseinipour, M.C., Frenkel, L.M., et al. (2015b). HIV-1 Drug Resistance Mutations: Potential Applications for Point-of-Care Genotypic Resistance Testing. *PloS One* *10*, e0145772.
- Ritchie, A.V., Ushiro-Lumb, I., Edemaga, D., Joshi, H.A., De Ruiter, A., Szumilin, E., Jendrulek, I., McGuire, M., Goel, N., Sharma, P.I., et al. (2014). SAMBA HIV semiquantitative test, a new point-of-care viral-load-monitoring assay for resource-limited settings. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 3377–3383.
- Roberts, J.D., Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* *242*, 1171–1173.
- Roberts, T., Cohn, J., Bonner, K., and Hargreaves, S. (2016). Scale-up of Routine Viral Load Testing in Resource-Poor Settings: Current and Future Implementation Challenges. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *62*, 1043–1048.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature* *374*, 124–126.
- Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., et al. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science* *288*, 55–55.
- Rokx, C., Schurink, C.A.M., Boucher, C.A.B., and Rijnders, B.J.A. (2016). Dolutegravir as maintenance monotherapy: first experiences in HIV-1 patients. *J. Antimicrob. Chemother.* *71*, 1632–1636.
- Rossouw, T.M., Nieuwoudt, M., Manasa, J., Malherbe, G., Lessells, R.J., Pillay, S., Danaviah, S., Mahasha, P., van Dyk, G., and de Oliveira, T. (2016). HIV drug resistance levels in adults failing first-line antiretroviral therapy in an urban and a rural setting in South Africa. *HIV Med.*
- Rottinghaus, E., Bile, E., Modukanele, M., Maruping, M., Mine, M., Nkengasong, J., and Yang, C. (2013). Comparison of Ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 55–60.
- Rottinghaus, E.K., Beard, R.S., Bile, E., Modukanele, M., Maruping, M., Mine, M., Nkengasong, J., and Yang, C. (2014). Evaluation of dried blood spots collected on filter papers from three manufacturers stored at ambient temperature for application in HIV-1 drug resistance monitoring. *PloS One* *9*, e109060.
- Rouet, F., and Rouzioux, C. (2007). HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new? *Expert Rev. Mol. Diagn.* *7*, 703–707.

- Rouet, F., Ekouevi, D.K., Chaix, M.-L., Burgard, M., Inwoley, A., Tony, T.D., Danel, C., Anglaret, X., Leroy, V., Msellati, P., et al. (2005). Transfer and Evaluation of an Automated, Low-Cost Real-Time Reverse Transcription-PCR Test for Diagnosis and Monitoring of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in a West African Resource-Limited Setting. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 2709–2717.
- Rouet, F., Chaix, M.-L., Nerrienet, E., Ngo-Giang-Huong, N., Plantier, J.-C., Burgard, M., Peeters, M., Damond, F., Ekouevi, D.K., Msellati, P., et al. (2007). Impact of HIV-1 Genetic Diversity on Plasma HIV-1 RNA Quantification: Usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA Second-Generation Long Terminal Repeat-Based Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Test. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *45*, 380–388.
- Rouet, F., Ménan, H., Viljoen, J., Ngo-Giang-Huong, N., Mandaliya, K., Valéa, D., Lien, T.X., Danaviah, S., Rousset, D., Ganon, A., et al. (2008). In-house HIV-1 RNA real-time RT-PCR assays: principle, available tests and usefulness in developing countries. *Expert Rev. Mol. Diagn.* *8*, 635–650.
- Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valéa, D., Danaviah, S., Segondy, M., Verhofstede, C., Van de Perre, P., et al. (2010). Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *J. Virol. Methods* *163*, 253–257.
- Rouet, F., Liégeois, F., Mouinga-Ondémé, A., Kania, D., Viljoen, J., Wambua, S., Ngo-Giang-Huong, N., Ménan, H., Peeters, M., and Nerrienet, E. (2011). Current challenges to viral load testing in the context of emerging genetic diversity of HIV-1. *Expert Opin. Med. Diagn.* *5*, 183–202.
- Rouet, F., Kania, D., Tuillon, E., Maiga, A., Nouhin, J., Rouzioux, C., Descamps, D., and Plantier, J.-C. (2014). Use of reverse transcription-PCR-based assays for quantification of HIV-1 in dried blood spots requires specific HIV-1 RNA isolation for monitoring of antiretroviral treatment efficiency. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 2740–2741.
- Rua, R., and Gessain, A. (2015). Origin, evolution and innate immune control of simian foamy viruses in humans. *Curr. Opin. Virol.* *10*, 47–55.
- Ruelle, J., Jnaoui, K., Lefèvre, I., Lamarti, N., and Goubau, P. (2009). Comparative evaluation of the VERSANT HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantification of HIV-1 plasma viral load. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *44*, 297–301.
- Ruelle, J., Debaisieux, L., Vancutsem, E., De Bel, A., Delforge, M.-L., Piérard, D., and Goubau, P. (2012). HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. *BMC Infect. Dis.* *12*, 100.
- Rutstein, S.E., Kamwendo, D., Lugali, L., Thengolose, I., Tegha, G., Fiscus, S.A., Nelson, J.A.E., Hosseinipour, M.C., Sarr, A., Gupta, S., et al. (2014). Measures of viral load using Abbott RealTime HIV-1 Assay on venous and fingerstick dried blood spots from

- provider-collected specimens in Malawian District Hospitals. *J. Clin. Virol.* *60*, 392–398.
- Rutstein, S.E., Hosseinipour, M.C., Kamwendo, D., Soko, A., Mkandawire, M., Biddle, A.K., Miller, W.C., Weinberger, M., Wheeler, S.B., Sarr, A., et al. (2015). Dried blood spots for viral load monitoring in Malawi: feasible and effective. *PloS One* *10*, e0124748.
- Saenz, R.A., and Bonhoeffer, S. (2013). Nested model reveals potential amplification of an HIV epidemic due to drug resistance. *Epidemics* *5*, 34–43.
- Salimo, A.T., Ledwaba, J., Coovadia, A., Abrams, E.J., Technau, K.-G., Kuhn, L., Morris, L., and Hunt, G.M. (2015). The use of dried blood spot specimens for HIV-1 drug resistance genotyping in young children initiating antiretroviral therapy. *J. Virol. Methods* *223*, 30–32.
- Salou, M., Dagnra, A.Y., Butel, C., Vidal, N., Serrano, L., Takassi, E., Konou, A.A., Houndenou, S., Dapam, N., Singo-Tokofaï, A., et al. (2016). High rates of virological failure and drug resistance in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving lifelong antiretroviral therapy in routine clinics in Togo. *J. Int. AIDS Soc.* *19*.
- Samji, H., Cescon, A., Hogg, R.S., Modur, S.P., Althoff, K.N., Buchacz, K., Burchell, A.N., Cohen, M., Gebo, K.A., Gill, M.J., et al. (2013). Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada. *PloS One* *8*, e81355.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5463–5467.
- Sauné, K., Haslé, C., Boineau, J., Raymond, S., Mengelle, C., and Izopet, J. (2015). Analytical performance of VERIS MDx system HIV assay for quantifying HIV RNA. *J. Clin. Virol.* *70*, S105.
- Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W.N., Münch, J., Kim, K.-A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B.F., et al. (2009). Tetherin-Driven Adaptation of Vpu and Nef Function and the Evolution of Pandemic and Nonpandemic HIV-1 Strains. *Cell Host Microbe* *6*, 409–421.
- Sawadogo, S., Shiningavamwe, A., Chang, J., Maher, A.D., Zhang, G., Yang, C., Gaeb, E., Kaura, H., Ellenberger, D., and Lowrance, D.W. (2014). Limited utility of dried-blood- and plasma spot-based screening for antiretroviral treatment failure with Cobas Ampliprep/TaqMan HIV-1 version 2.0. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 3878–3883.
- Sax, P.E. (2013). Editorial commentary: can we break the habit of routine CD4 monitoring in HIV care? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *56*, 1344–1346.
- Sax, P.E., Wohl, D., Yin, M.T., Post, F., DeJesus, E., Saag, M., Pozniak, A., Thompson, M., Podzamczak, D., Molina, J.M., et al. (2015). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet Lond. Engl.* *385*, 2606–2615.

- Scherrer, A.U., von Wyl, V., Yang, W.-L., Kouyos, R.D., Böni, J., Yerly, S., Klimkait, T., Aubert, V., Cavassini, M., Battegay, M., et al. (2016). Emergence of Acquired HIV-1 Drug Resistance Almost Stopped in Switzerland: A 15-Year Prospective Cohort Analysis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 62, 1310–1317.
- Schumacher, W., Frick, E., Kauselmann, M., Maier-Hoyle, V., van der Vliet, R., and Babiak, R. (2007). Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 38, 304–312.
- Scott, L., Carmona, S., and Stevens, W. (2009). Performance of the new Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan version 2.0 human immunodeficiency virus type 1 assay. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3400–3402.
- SECOND-LINE Study Group, Boyd, M.A., Kumarasamy, N., Moore, C.L., Nwizu, C., Losso, M.H., Mohapi, L., Martin, A., Kerr, S., Sohn, A.H., et al. (2013). Ritonavir-boosted lopinavir plus nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors versus ritonavir-boosted lopinavir plus raltegravir for treatment of HIV-1 infection in adults with virological failure of a standard first-line ART regimen (SECOND-LINE): a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet Lond. Engl.* 381, 2091–2099.
- Semper, A.E., Broadhurst, M.J., Richards, J., Foster, G.M., Simpson, A.J.H., Logue, C.H., Kelly, J.D., Miller, A., Brooks, T.J.G., Murray, M., et al. (2016). Performance of the GeneXpert Ebola Assay for Diagnosis of Ebola Virus Disease in Sierra Leone: A Field Evaluation Study. *PLoS Med.* 13.
- Serwadda, D., Mugerwa, R.D., Sewankambo, N.K., Lwegaba, A., Carswell, J.W., Kirya, G.B., Bayley, A.C., Downing, R.G., Tedder, R.S., and Clayden, S.A. (1985). Slim disease: a new disease in Uganda and its association with HTLV-III infection. *Lancet Lond. Engl.* 2, 849–852.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2008). AIDS: Prehistory of HIV-1. *Nature* 455, 605–606.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650.
- Sherman, G.G., Stevens, G., Jones, S.A., Horsfield, P., and Stevens, W.S. (2005). Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 38, 615–617.
- Shubber, Z., Calmy, A., Andrieux-Meyer, I., Vitoria, M., Renaud-Théry, F., Shaffer, N., Hargreaves, S., Mills, E.J., and Ford, N. (2013). Adverse events associated with nevirapine and efavirenz-based first-line antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *AIDS Lond. Engl.* 27, 1403–1412.
- Sidley, P. (2000). Mandela restores morale of AIDS conference. *BMJ* 321, 193.
- Sigaloff, K.C.E., Hamers, R.L., Wallis, C.L., Kityo, C., Siwale, M., Ive, P., Botes, M.E., Mandaliya, K., Wellington, M., Osibogun, A., et al. (2011a). Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two

- arguments for viral load monitoring in Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 *58*, 23–31.
- Sigaloff, K.C.E., Calis, J.C.J., Geelen, S.P., van Vugt, M., and de Wit, T.F.R. (2011b). HIV-1-resistance-associated mutations after failure of first-line antiretroviral treatment among children in resource-poor regions: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* *11*, 769–779.
- Sigaloff, K.C.E., Hamers, R.L., Menke, J., Labib, M., Siwale, M., Ive, P., Botes, M.E., Kityo, C., Mandaliya, K., Wellington, M., et al. (2012). Early warning indicators for population-based monitoring of HIV drug resistance in 6 African countries. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *54 Suppl 4*, S294-299.
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* *4*, 1032–1037.
- Sire, J.-M., Vray, M., Merzouk, M., Plantier, J.-C., Pavie, J., Maylin, S., Timsit, J., Lascoux-Combe, C., Molina, J.-M., Simon, F., et al. (2011). Comparative RNA quantification of HIV-1 group M and non-M with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 and Abbott Real-Time HIV-1 PCR assays. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 *56*, 239–243.
- Sizmann, D., Glaubitz, J., Simon, C.O., Goedel, S., Buergisser, P., Drogan, D., Hesse, M., Kröh, M., Simmler, P., Dewald, M., et al. (2010). Improved HIV-1 RNA quantitation by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 using a novel dual-target approach. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *49*, 41–46.
- Smit, P.W., Elliott, I., Peeling, R.W., Mabey, D., and Newton, P.N. (2014). An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *90*, 195–210.
- Sollis, K.A., Smit, P.W., Fiscus, S., Ford, N., Vitoria, M., Essajee, S., Barnett, D., Cheng, B., Crowe, S.M., Denny, T., et al. (2014). Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. *PloS One* *9*, e85869.
- Soria, A., Porten, K., Fampou-Toundji, J.-C., Galli, L., Mougnotou, R., Buard, V., Kfutwah, A., Vessière, A., Rousset, D., Teck, R., et al. (2009). Resistance profiles after different periods of exposure to a first-line antiretroviral regimen in a Cameroonian cohort of HIV type-1-infected patients. *Antivir. Ther.* *14*, 339–347.
- de Sousa, J.D., Alvarez, C., Vandamme, A.-M., and Müller, V. (2012). Enhanced heterosexual transmission hypothesis for the origin of pandemic HIV-1. *Viruses* *4*, 1950–1983.
- Stadeli, K.M., and Richman, D.D. (2012). Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: a systematic review. *Antivir. Ther.* *18*, 115–123.
- Staszewski, S. (1995). Zidovudine and lamivudine: results of phase III studies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *10 Suppl 1*, S57.

- Steege, K., Luchters, S., De Cabooter, N., Reynaerts, J., Mandaliya, K., Plum, J., Jaoko, W., Verhofstede, C., and Temmerman, M. (2007). Evaluation of two commercially available alternatives for HIV-1 viral load testing in resource-limited settings. *J. Virol. Methods* *146*, 178–187.
- Steinmetzer, K., Seidel, T., Stallmach, A., and Ermantraut, E. (2010). HIV load testing with small samples of whole blood. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 2786–2792.
- Stevens, W., Erasmus, L., Moloji, M., Taleng, T., and Sarang, S. (2008). Performance of a Novel Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Total Nucleic Acid-Based Real-Time PCR Assay Using Whole Blood and Dried Blood Spots for Diagnosis of HIV in Infants. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 3941–3945.
- Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, Emery, S., Neuhaus, J.A., Phillips, A.N., Babiker, A., Cohen, C.J., Gatell, J.M., Girard, P.-M., Grund, B., Law, M., et al. (2008). Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naïve participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J. Infect. Dis.* *197*, 1133–1144.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* *427*, 848–853.
- Styer, L.M., Miller, T.T., and Parker, M.M. (2013). Validation and clinical use of a sensitive HIV-2 viral load assay that uses a whole virus internal control. *J. Clin. Virol.* *58*, *Supplement 1*, e127–e133.
- Swanson, P., de Mendoza, C., Joshi, Y., Golden, A., Hodinka, R.L., Soriano, V., Devare, S.G., and Hackett, J. (2005). Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 3860–3868.
- Swenson, L.C., Cobb, B., Geretti, A.M., Harrigan, P.R., Poljak, M., Seguin-Devaux, C., Verhofstede, C., Wirden, M., Amendola, A., Boni, J., et al. (2014). Comparative performances of HIV-1 RNA load assays at low viral load levels: results of an international collaboration. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 517–523.
- Taieb, F., Aghokeng, A.F., Eymard-Duvernay, S., Chia, J.E., Einterz, E., Mpoudi-Ngole, E., Peeters, M., Molina, J.-M., and Delaporte, E. (2014). Challenges of antiretroviral treatment monitoring in rural and remote-access regions in Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *30*, 623–625.
- Tang, M.W., and Shafer, R.W. (2012). HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* *72*, e1-25.
- Tang, M.W., Rhee, S.-Y., Bertagnolio, S., Ford, N., Holmes, S., Sigaloff, K.C., Hamers, R.L., Wit, T.F.R. de, Fleury, H.J., Kanki, P.J., et al. (2013). Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations Associated with First-Line Stavudine-Containing Antiretroviral Therapy: Programmatic Implications for Countries Phasing Out Stavudine. *J. Infect. Dis.* *207*, S70–S77.

- Tang, N., Huang, S., Salituro, J., Mak, W.-B., Cloherty, G., Johanson, J., Li, Y.H., Schneider, G., Robinson, J., Hackett, J., et al. (2007). A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *J. Virol. Methods* *146*, 236–245.
- Tanser, F., Bärnighausen, T., Grapsa, E., Zaidi, J., and Newell, M.-L. (2013). High coverage of ART associated with decline in risk of HIV acquisition in rural KwaZulu-Natal, South Africa. *Science* *339*, 966–971.
- Tanser, F., de Oliveira, T., Maheu-Giroux, M., and Bärnighausen, T. (2014). Concentrated HIV sub-epidemics in generalized epidemic settings. *Curr. Opin. HIV AIDS* *9*, 115–125.
- Tatarelli, P., Taramasso, L., Di Biagio, A., Sticchi, L., Nigro, N., Barresi, R., Viscoli, C., and Bruzzone, B. (2016). HIV-1 RNA quantification in CRF02_AG HIV-1 infection: too easy to make mistakes. *New Microbiol.* *39*, 150–152.
- Tebit, D.M., Patel, H., Ratcliff, A., Alessandri, E., Liu, J., Carpenter, C., Plantier, J.-C., and Arts, E.J. (2016). HIV-1 Group O Genotypes and Phenotypes: Relationship to Fitness and Susceptibility to Antiretroviral Drugs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.
- Telesnitsky, A., and Goff, S.P. (1997). Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- TEMPRANO ANRS 12136 Study Group, Danel, C., Moh, R., Gabillard, D., Badje, A., Le Carrou, J., Ouassa, T., Ouattara, E., Anzian, A., Ntakpé, J.-B., et al. (2015). A Trial of Early Antiretrovirals and Isoniazid Preventive Therapy in Africa. *N. Engl. J. Med.* *373*, 808–822.
- TenoRes Study Group, 2016. (2016). Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* *16*, 565–575.
- Thiam, M., Diop-Ndiaye, H., Kebe, K., Vidal, N., Diakhate-Lô, R., Diouara, A.A.M., Leye, N., Ndiaye, O., Sow, A., Ngom-Gueye, N.F., et al. (2013). Performance of the ViroSeq HIV-1 genotyping system v2.0 on HIV-1 strains circulating in Senegal. *J. Virol. Methods* *188*, 97–103.
- Tözsér, J. (2010). Comparative Studies on Retroviral Proteases: Substrate Specificity. *Viruses* *2*, 147–165.
- TREAT Asia Pediatric HIV Observational Database (TApHOD), and International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS (IeDEA) Southern Africa Paediatric Group (2011). A biregional survey and review of first-line treatment failure and second-line paediatric antiretroviral access and use in Asia and southern Africa. *J. Int. AIDS Soc.* *14*, 7.
- Tropan, K.T., Stelzl, E., Violan, D., Winkler, M., and Kessler, H.H. (2009). Evaluation of the new VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *46*, 69–74.

- Tsiara, C.G., Nikolopoulos, G.K., Bagos, P.G., Goujard, C., Katzenstein, T.L., Minga, A.K., Rouzioux, C., and Hatzakis, A. (2012). Impact of HIV type 1 DNA levels on spontaneous disease progression: a meta-analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 366–373.
- Ugbena, R., Aberle-Grasse, J., Diallo, K., Bassey, O., Jelpé, T., Rottinghaus, E., Azeez, A., Akpan, R., Muhammad, M., Shanmugam, V., et al. (2012). Virological response and HIV drug resistance 12 months after antiretroviral therapy initiation at 2 clinics in Nigeria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 54 *Suppl* 4, S375-380.
- UNAIDS, 2013. 90-90-90: An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en_0.pdf. [accessed 22/06/2016].
- UNAIDS, 2014. Fast-track: ending the AIDS epidemic by 2030. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2686_WAD2014report_en.pdf. 2014 [accessed 06/06/2016].
- UNAIDS, 2015. '15 by 15' - a global target. http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/15_by_15_a_global_target_achieved [consulté le 04/01/16].
- UNAIDS, 2016a. Factsheet. <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. [accessed 22/6/2016].
- UNAIDS, 2016b. Global AIDS Update. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-aids-update-2016-pub/en/> [accessed 06/06/2016]
- UNITAID, 2015. HIV/AIDS Diagnostics technology landscape. 5th edition. http://unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID_HIV_Nov_2015_Dx_Landscape.PDF Consulté le 17/03/16
- United Nations, 2016. On the fast-track to ending the AIDS epidemic. http://sgreport.unaids.org/pdf/20160423_SGreport_HLM_en.pdf [accessed 07/06/2016].
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptué, L., Ndembi, N., Gürtler, L., et al. (2011). Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J. Virol.* 85, 1403–1407.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3, 245–252.
- Van de Perre, P., Rouvroy, D., Lepage, P., Bogaerts, J., Kestelyn, P., Kayihigi, J., Hekker, A.C., Butzler, J.P., and Clumeck, N. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet Lond. Engl.* 2, 62–65.
- Van den Bergh, R., Chaillet, P., Sow, M.S., Amand, M., van Vyve, C., Jonckheere, S., Crestani, R., Sprecher, A., Van Herp, M., Chua, A., et al. (2016). Feasibility of Xpert Ebola

- Assay in Médecins Sans Frontières Ebola Program, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 210–216.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., et al. (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444, 164.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Neel, C., Lafay, B., Keele, B.F., Shaw, K.S., Takehisa, J., Kraus, M.H., Loul, S., et al. (2007). Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 368, 155–171.
- Vella, S. (2015). End of AIDS on the horizon, but innovation needed to end HIV. *Lancet HIV* 2, e74–e75.
- Vergne, L., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Liegeois, F., Toure-Kane, C., Mboup, S., Mulanga-Kabeya, C., Saman, E., Jourdan, J., et al. (2000). Genetic Diversity of Protease and Reverse Transcriptase Sequences in Non-Subtype-B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains: Evidence of Many Minor Drug Resistance Mutations in Treatment-Naive Patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3919–3925.
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., Laurent, C., Butel, C., Zekeng, L., Delaporte, E., et al. (2003). Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* 310, 254–266.
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., and Delaporte, E. (2000). Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* 74, 10498–10507.
- Vidya, M., Saravanan, S., Rifkin, S., Solomon, S.S., Waldrop, G., Mayer, K.H., Solomon, S., and Balakrishnan, P. (2012). Dried blood spots versus plasma for the quantitation of HIV-1 RNA using a real-Time PCR, m2000rt assay. *J. Virol. Methods* 181, 177–181.
- van de Vijver, D.A., Wensing, A.M.J., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.-L., Costagliola, D., De Luca, A., et al. (2006). The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 41, 352–360.
- Viljoen, J., Gampini, S., Danaviah, S., Valéa, D., Pillay, S., Kania, D., Méda, N., Newell, M.-L., Van de Perre, P., Rouet, F., et al. (2010). Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 55, 290–298.
- Villabona-Arenas, C.J., Domyeum, J., Mouacha, F., Butel, C., Delaporte, E., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., and Aghokeng, A.F. (2015). HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 36, 210–216.

- Villabona-Arenas, C.J., Vidal, N., Guichet, E., Serrano, L., Delaporte, E., Gascuel, O., and Peeters, M. (2016). In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa. *AIDS Lond. Engl.*
- Violari, A., Cotton, M.F., Gibb, D.M., Babiker, A.G., Steyn, J., Madhi, S.A., Jean-Philippe, P., McIntyre, J.A., and CHER Study Team (2008). Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N. Engl. J. Med.* *359*, 2233–2244.
- Visseaux, B., Charpentier, C., Bertine, M., Besseghir, A., Fagard, C., Damond, F., Matheron, S., Hué, S., Descamps, D., ANRS CO5 HIV-2 Cohort. (2016a) HIV-2 group A in France displayed 2 clades with distinct geographical origins. Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Boston, USA. Abstract 214.
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., and Charpentier, C. (2016b). Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*
- Vitoria, M., Ford, N., Doherty, M., and Flexner, C. (2014). Simplification of antiretroviral therapy: a necessary step in the public health response to HIV/AIDS in resource-limited settings. *Antivir. Ther.* *19*, 31–37.
- Vitoria, M., Hill, A.M., Ford, N.P., Doherty, M., Khoo, S.H., and Pozniak, A.L. (2016). Choice of antiretroviral drugs for continued treatment scale-up in a public health approach: what more do we need to know? *J. Int. AIDS Soc.* *19*.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9236–9241.
- Vogt, F., Tayler-Smith, K., Bernasconi, A., Makondo, E., Taziwa, F., Moyo, B., Havazvidi, L., Satyanarayana, S., Manzi, M., Khogali, M., et al. (2015). Access to CD4 Testing for Rural HIV Patients: Findings from a Cohort Study in Zimbabwe. *PloS One* *10*, e0129166.
- Wagner, B.G., Garcia-Lerma, J.G., and Blower, S. (2012). Factors limiting the transmission of HIV mutations conferring drug resistance: fitness costs and genetic bottlenecks. *Sci. Rep.* *2*, 320.
- Wagner, S., Kurz, M., Klimkait, T., and Swiss HIV Cohort Study (2015). Algorithm evolution for drug resistance prediction: comparison of systems for HIV-1 genotyping. *Antivir. Ther.* *20*, 661–665.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* *40*, 9–17.
- Wallis, C.L., Aga, E., Ribaldo, H., Saravanan, S., Norton, M., Stevens, W., Kumarasamy, N., Bartlett, J., Katzenstein, D., and on behalf of the A5230 team (2014). Drug Susceptibility and Resistance Mutations After First-Line Failure in Resource Limited Settings. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*
- Walmsley, S., Baumgarten, A., Berenguer, J., Felizarta, F., Florence, E., Khuong-Josses, M.-A., Kilby, J.M., Lutz, T., Podzamczar, D., Portilla, J., et al. (2015). Brief Report:

- Dolutegravir Plus Abacavir/Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection in Antiretroviral Therapy-Naive Patients: Week 96 and Week 144 Results From the SINGLE Randomized Clinical Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 *70*, 515–519.
- Walmsley, S.L., Antela, A., Clumeck, N., Duiculescu, D., Eberhard, A., Gutiérrez, F., Hocqueloux, L., Maggiolo, F., Sandkovsky, U., Granier, C., et al. (2013). Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* *369*, 1807–1818.
- Wang, S., Xu, F., and Demirci, U. (2010). Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnol. Adv.* *28*, 770–781.
- Waters, L., Kambugu, A., Tibenderana, H., Meya, D., John, L., Mandalia, S., Nabankema, M., Namugga, I., Quinn, T.C., Gazzard, B., et al. (2007). Evaluation of filter paper transfer of whole-blood and plasma samples for quantifying HIV RNA in subjects on antiretroviral therapy in Uganda. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 *46*, 590–593.
- Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., and Hahn, B.H. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* *373*, 117–122.
- Weidle, P.J., Malamba, S., Mwebaze, R., Sozi, C., Rukundo, G., Downing, R., Hanson, D., Ochola, D., Mugenyi, P., Mermin, J., et al. (2002). Assessment of a pilot antiretroviral drug therapy programme in Uganda: patients' response, survival, and drug resistance. *Lancet Lond. Engl.* *360*, 34–40.
- Weiss, R.A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* *3*, 67.
- Wensing, A.M., Calvez, V., Günthard, H.F., Johnson, V.A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R.W., and Richman, D.D. (2015). 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* *23*, 132–141.
- Wertheim, J.O., and Worobey, M. (2009). Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000377.
- WHO, 2002. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings. Guidelines for a public health approach. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/pub18/en/> [accessed 17/03/2016].
- WHO, 2003. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach. http://www.who.int/3by5/publications/documents/arv_guidelines/en/ [accessed 17/03/2016].
- WHO, 2006. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach (2006 revision) <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult/en/> [accessed 17/03/2016].
- WHO, 2010. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach (2010 revision) <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/> [accessed 17/03/2016].

- WHO, 2012. World health organization global strategy for the surveillance and monitoring of HIV drug resistance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768_eng.pdf?ua=1 [accessed 18/04/2016].
- WHO, 2013. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and prevention HIV infection. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/download/en/> [accessed 17/03/2016].
- WHO, 2014a. Technical and operational consideration for implementation HIV viral load testing. Interim technical update. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/viral-load-testing-technical-update/en/> [accessed 11/01/2016].
- WHO, 2014b. The availability and use of diagnostics for HIV: a 2012/2013 WHO survey of low- and middle-income countries. Technical report. <http://www.who.int/hiv/pub/amds/amds-diagnostics-survey-dec2014/en/> [accessed 11/01/2016].
- WHO, 2015a. Global health sector response to HIV, 2000-2015: focus on innovations in Africa. Progress report. <http://www.who.int/hiv/pub/progressreports/2015-progress-report/en/> [accessed 17/06/2016].
- WHO, 2015b. Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. <http://www.who.int/entity/hiv/pub/guidelines/earlyrelease-arv/en/> [accessed 04/01/2016].
- WHO, 2016a. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach - Second edition 2016. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/> [accessed 22/06/2016].
- WHO, 2016b. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance. Technical report. <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/ewi-hivdr-2016/en/> [accessed 01/08/2016].
- Worobey, M., Watts, T. D., McKay, R.A., Granade, T., Koblin B. A., Heneine, W., Jaffe H. W. (2016). 1970s HIV-1 genomes reveal the early history of the north american HIV/AIDS epidemic. Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Boston, USA. Abstract 140.
- Wilens, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2.
- Winand, R., Theys, K., Eusébio, M., Aerts, J., Camacho, R.J., Gomes, P., Suchard, M.A., Vandamme, A.-M., Abecasis, A.B., and Portuguese HIV-1 Resistance Study Group (2015). Assessing transmissibility of HIV-1 drug resistance mutations from treated and from drug-naive individuals. AIDS Lond. Engl. 29, 2045–2052.
- Working Group on Modelling of Antiretroviral Therapy Monitoring Strategies in Sub-Saharan Africa, Phillips, A., Shroufi, A., Vojnov, L., Cohn, J., Roberts, T., Ellman, T., Bonner, K., Rousseau, C., Garnett, G., et al. (2015). Sustainable HIV treatment in Africa through viral-load-informed differentiated care. Nature 528, S68-76.

- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D.E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.-J., Kabongo, J.-M.M., Kalengayi, R.M., Van Marck, E., et al. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* *455*, 661–664.
- Wu, X., Crask, M., Ramirez, H., Landas, T., Do, T.D., Honisch, C., Will, S., and Baum, P.D. (2015). A simple method to elute cell-free HIV from dried blood spots improves their usefulness for monitoring therapy. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *65*, 38–40.
- von Wyl, V., Ehteshami, M., Demeter, L.M., Bürgisser, P., Nijhuis, M., Symons, J., Yerly, S., Böni, J., Klimkait, T., Schuurman, R., et al. (2010). HIV-1 reverse transcriptase connection domain mutations: dynamics of emergence and implications for success of combination antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *51*, 620–628.
- Xu, S., Song, A., Nie, J., Li, X., Meng, S., Zhang, C., and Wang, Y. (2012). Comparison between the automated Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 assay and its version 1 and Nuclisens HIV-1 EasyQ version 2.0 assays when measuring diverse HIV-1 genotypes in China. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *53*, 33–37.
- Yang, W.-L., Kouyos, R.D., Böni, J., Yerly, S., Klimkait, T., Aubert, V., Scherrer, A.U., Shilaih, M., Hinkley, T., Petropoulos, C., et al. (2015a). Persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations associated with fitness costs and viral genetic backgrounds. *PLoS Pathog.* *11*, e1004722.
- Yang, W.-L., Kouyos, R., Scherrer, A.U., Böni, J., Shah, C., Yerly, S., Klimkait, T., Aubert, V., Furrer, H., Battegay, M., et al. (2015b). Assessing the Paradox Between Transmitted and Acquired HIV Type 1 Drug Resistance Mutations in the Swiss HIV Cohort Study From 1998 to 2012. *J. Infect. Dis.* *212*, 28–38.
- Yapo, V., d'Aquin Toni, T. d'Aquin, Desmonde, S., Amani-Bosse, C., Oga, M., Lenaud, S., Menan, H., Timité-Konan, M., Leroy, V., and Rouzioux, C. (2013). Evaluation of dried blood spot diagnosis using HIV1-DNA and HIV1-RNA Biocentric assays in infants in Abidjan, Côte d'Ivoire. The Pedi-Test DBS ANRS 12183 Study. *J. Virol. Methods* *193*, 439–445.
- You, J., Wang, H., Huang, X., Qin, Z., Deng, Z., Luo, J., Wang, B., and Li, M. (2016). Therapy-Emergent Drug Resistance to Integrase Strand Transfer Inhibitors in HIV-1 Patients: A Subgroup Meta-Analysis of Clinical Trials. *PloS One* *11*, e0160087.
- Young, J., Rickenbach, M., Calmy, A., Bernasconi, E., Staehelin, C., Schmid, P., Cavassini, M., Battegay, M., Günthard, H.F., Bucher, H.C., et al. (2015). Transient detectable viremia and the risk of viral rebound in patients from the Swiss HIV Cohort Study. *BMC Infect. Dis.* *15*, 382.
- Zhou, Z., Wagar, N., DeVos, J.R., Rottinghaus, E., Diallo, K., Nguyen, D.B., Bassey, O., Ugbeno, R., Wadonda-Kabondo, N., McConnell, M.S., et al. (2011). Optimization of a Low Cost and Broadly Sensitive Genotyping Assay for HIV-1 Drug Resistance Surveillance and Monitoring in Resource-Limited Settings. *PLOS ONE* *6*, e28184.

- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594–597.
- Zida, S., Tuailon, E., Barro, M., Kwimatouo Lekpa, A.F., Kagoné, T., Nacro, B., Abdoul Salam, O., Bolloré, K., Sanosyan, A., Plantier, J.-C., et al. (2016). Estimation of HIV-1 DNA level interfering with the reliability of HIV-1 RNA quantification performed on dried blood spots (DBS) collected from successfully treated patients. *J. Clin. Microbiol.*
- Ziegler, J.B., Cooper, D.A., Johnson, R.O., and Gold, J. (1985). Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. *Lancet Lond. Engl.* 1, 896–898.
- Zoufaly, A., Jochum, J., Hammerl, R., Nassimi, N., Raymond, Y., Burchard, G.D., Schmiedel, S., Drexler, J.F., Campbell, N.K., Taka, N., et al. (2014). Virological failure after 1 year of first-line ART is not associated with HIV minority drug resistance in rural Cameroon. *J. Antimicrob. Chemother.* dku470.

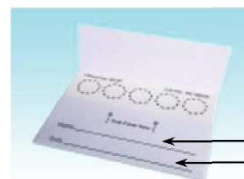
Annexe

Annexe A1 : Préparation des DBS à partir de tube de sang total EDTA (adapté du protocole de laboratoire UMI 233 de Montpellier).

1. Après avoir collecté du sang total sur tubes EDTA, retourner plusieurs fois le tube pour homogénéiser.



2. Identifier la carte DBS (code patient, nom de l'étude ...) et inscrire la date à "**Date**".



Code
Date de prélèvement

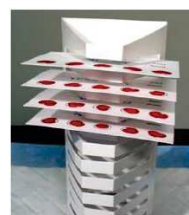
3. Déposer délicatement, au centre de chaque cercle, **50µL** de sang total avec une micro-pipette sans toucher la carte (5 cercles).



1 spot = 50µL de sang total

4. Laisser sécher pendant **3 heures minimum jusqu'à toute une nuit** à température ambiante :

- à l'air libre (sur le portoir ou directement sur une paillasse préalablement nettoyée)
- éloigné de la poussière
- à l'abri du soleil +++



3:00 hrs de séchage minimum

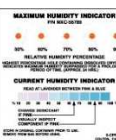
5. Refermer la languette de la carte pour protéger les prélèvements et mettre la carte dans un **sac plastique zippé**.

6. Ajouter 2 dessiccants dans le sac et le refermer hermétiquement **en chassant l'air**.



Mettre
sacs zippés
+
indicateur
d'humidité

7. Mettre plusieurs sacs zippés dans le « foil-barrier ziploc bag », ajouter des dessiccants (environ 5) et **1 indicateur d'humidité** et fermer soigneusement en chassant l'air. Noter sur le sac : **date, nom de l'étude** et les **codes** correspondants aux patients.



+
dessiccants

8. Ranger le sac contenant les DBS dans un endroit le plus sec possible, toujours à l'abri de la chaleur ou dans un réfrigérateur à + 4°C si possible, le temps du transport au laboratoire (**1 mois maximum**).

9. Stocker ensuite à -20°C ou -80°C, pour une bonne conservation des DBS.