

2016-2017

Thèse

Pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**MISE AU POINT DE LA
TECHNIQUE DE GENOTYPAGE DE
RESISTANCE DU VIH-1 AUX
ANTIRETROVIRAUX SUR L'ADN
PROVIRAL AU LABORATOIRE DE
VIROLOGIE DU CHU D'ANGERS**

POUTIER Audrey ■

Née le 06 octobre 1993 à Château-Gontier (53)

Sous la direction de Mme **LE GUILLOU-GUILLEMETTE Hélène** ■

Membres du jury

EVEILLARD Matthieu	Président
LE GUILLOU-GUILLEMETTE Hélène	Directeur
APAIRE-MARCHAIS Véronique	Co-Directeur
VANDAMME Yves-Marie	Membre
PIVERT Adeline	Membre

Soutenue publiquement le :
14 novembre 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS

Année universitaire 2016-2017

DIRECTEUR DE L'UFR : LEROLLE Nicolas

DIRECTEUR ADJOINT DE L'UFR ET DIRECTEUR DU DEPARTEMENT

PHARMACIE : LAGARCE Frédéric

DIRECTEUR DU DEPARTEMENT MEDECINE : ANNWEILER Cédric

DEPARTEMENT PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENOIT Jean-Pierre
DUVAL Olivier
EVEILLARD Mathieu
FAURE Sébastien
GUILLET DAVID
LAGARCE Frédéric
LARCHER Gérald
MARCHAIS Véronique
PAPON Nicolas
PASSIRANI Catherine
RICHOMME Pascal
SAULNIER Patrick
SERAPHIN Denis
VENIER Marie-Claire

DISCIPLINES

Pharmacotechnie
Chimie thérapeutique
Bactériologie - Virologie
Pharmacologie - Physiologie
Chimie analytique
Biopharmacie
Biochimie - Biologie moléculaires
Bactériologie - Virologie
Parasitologie – Mycologie
Chimie générale
Pharmacognosie
Biophysique pharmaceutique - Biostatistique
Chimie Organique
Pharmacotechnie

MAITRES DE CONFERENCES

ANNAIX Véronique
BAGLIN Isabelle
BASTIAT Guillaume
BENOIT Jacqueline
BOISARD Séverine
CLERE Nicolas
DERBRE Séverine
DESHAYES Caroline
FLEURY Maxime
HELESBEUX Jean-Jacques
LANDREAU Anne
LEGEAY Samuel
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie
LEPELTIE Elise
MALLET Sabine
MAROT Agnès
NAIL BILLAUD Sandrine
PECH Brigitte
RIOU Jérémie
ROGER Emilie

DISCIPLINES

Biochimie - Biologie moléculaires
Pharmaco-chimie
Biophysique pharmaceutique - Biostatistique
Pharmacologie - Pharmacocinétique
Chimie analytique
Pharmacologie
Pharmacognosie
Bactériologie - Virologie
Immunologie
Chimie Organique
Botanique - Mycologie
Pharmacologie
Valorisation des substances naturelles
Chimie générale - Nanovectorisation
Chimie analytique - Bromatologie
Parasitologie - Mycologie médicale
Immunologie
Pharmacotechnie
Biostatistique
Pharmacotechnie

SCHINKOWITZ Andréas
TRICAUD Anne

Pharmacognosie
Biologie cellulaire

AUTRES ENSEIGNANTS

BRUNOIS-DEBUS Isabelle
CAVAILLON Pascal
LAFFILHE Jean-Louis
MOAL Frédéric

DISCIPLINES

Anglais
Pharmacie Industrielle
Officine
Physiologie

ATER (Assistants Enseignement Supérieur et Recherche)

DISCIPLINES

FOUDI Nabil

Physiologie - communication cellulaire

ENSEIGNANT CONTRACTUEL

DISCIPLINE

VIAULT Guillaume

Chimie

AHU (Assistants Hospitalo-Universitaire)

DISCIPLINES

BRIS Céline
LE ROUX Gaël
BRIOT Thomas
CHAPPE Marion

Biochimie - Biologie moléculaire
Toxicologie
Pharmacie Galénique
Pharmacotechnie

DEPARTEMENT MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

DISCIPLINES

ABRAHAM Pierre
ANNWEILER Cédric
ASFAR Pierre
AUBE CHRISTOPHE
AUGUSTO Jean-François
AZZOUZI Abdel Rahmène
BARON-HAURY Céline
BAUFRETON Christophe
BEAUCHET Olivier
BEYDON Laurent
BIGOT Pierre
BONNEAU Dominique
BOUCHARA Jean-Philippe
BOUVARD Béatrice
BOURSIER Jérôme
BRIET Marie
CAILLET Eric
CALES Paul
CAMPONE Mario

Physiologie
Gériatrie et biologie du vieillissement
Réanimation
Radiologie et imagerie médicale
Néphrologie
Urologie
Médecine générale
Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Gériatrie - Biologie du vieillissement
Anesthésiologie - Réanimation
Urologie
Génétique
Parasitologie - Mycologie
Rhumatologie
Gastroentérologie - Hépatologie
Pharmacologie
Médecine générale
Gastroentérologie - Hépatologie
Cancérologie - Radiothérapie

CAROLI-BOSC François-Xavier
 CHAPPARD Daniel
 CONNAN Laurent
 COUTANT Régis
 COUTURIER Olivier
 CUSTAUD Marc-Antoine
 DE BRUX Jean-Louis
 DESCAMPS Philippe
 DINOMAS Mickaël
 DIQUET Bertrand
 DUCANCELLE Alexandra
 DUVERGER Philippe
 EMON Bernard
 FANELLO Serge
 FOURNIER Henri-Dominique
 FURBER Alain
 GAGNADOUX Frédéric
 GARNIER François
 GASCOIN Géraldine
 GOHIER Bénédicte
 GRANRY Jean-Claude
 GUARDIOLA Philippe
 HAMY Antoine
 HUNAULT-BERGER Mathilde
 IFRAH Norbert
 JEANNIN Pascale
 KEMPF Marie
 LACCOURREYE Laurent
 LASOCKI Sigismond
 LEGRAND Erick
 LERMITE Emilie
 LEROLLE Nicolas
 LUNEL-FABIANI Françoise
 MARTIN Ludovic
 MENEI Philippe
 MERCAT Alain
 MERCIER Philippe
 PELLIER Isabelle
 PICQUET Jean
 PODEVIN Guillaume
 PROCACCIO Vincent
 PRUNIER Fabrice
 REYNIER Pascal
 RICHARD Isabelle
 RODIEN Patrice
 ROHMER Vincent
 ROQUELAURE Yves
 ROUGE-MAILLART Clotilde
 ROUSSEAU Audrey
 ROUSSEAU Pascal
 ROUSSELET M-Christine
 ROY Pierre-Marie
 SAINT-ANDRE Jean-Paul

Gastroentérologie - Hépatologie
 Cytologie - Histologie
 Médecin Générale
 Pédiatrie
 Biophysique et médecine nucléaire
 Physiologie
 Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
 Gynécologie - obstétrique
 Médecine physique et réadaptation
 Pharmacologie
 Bactériologie - Virologie - Hygiène hospitalière
 Pédopsychiatrie
 Chirurgie vasculaire - Médecine vasculaire
 Epidémiologie - Economie de la santé -Prévention
 Anatomie
 Cardiologie
 Pneumologie
 Médecine générale
 Pédiatrie
 Psychiatrie d'adultes
 Anesthésiologie - Réanimation
 Hématologie - Transfusion
 Chirurgie générale
 Hématologie -Transfusion
 Hématologie - Transfusion
 Immunologie
 Bactériologie - Virologie - Hygiène hospitalière
 Oto-rhino-laryngologie
 Anesthésiologie - Réanimation
 Rhumatologie
 Chirurgie générale
 Réanimation
 Bactériologie - Virologie - Hygiène hospitalière
 Dermato-vénéréologie
 Neurochirurgie
 Réanimation
 Anatomie
 Pédiatrie
 Chirurgie vasculaire - Médecine vasculaire
 Chirurgie infantile
 Génétique
 Cardiologie
 Biochimie - Biologie moléculaire
 Médecin physique et de réadaptation
 Endocrinologie - Diabète, Maladies métaboliques
 Endocrinologue - Diabète, Maladies métaboliques
 Médecine et santé au travail
 Médecine légale et droit de la santé
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Thérapeutique
 Anatomie et cytologie pathologiques

SUBRA Jean-François
UGO Valérie
URBAN Thierry
VAN BOGAERT Patrick
VERNY Christophe
WILLOTEAUX Serge
ZAHAR Jean-Ralph
ZANDECKI Marc

MAITRES DE CONFERENCES

ANGOULVANT Cécile
BEAUVILLANI Céline
BELIZNA Christina
BELLANGER William
BELONCLE François
BIERE Loïc
BLANCHET Odile
CAPITAIN Olivier
CASSEREAU Julien
CHEVAILLER Alain
CHEVALIER Sylvie
COLIN Estelle
DE CASABIANCA Catherine
FERRE Marc
FORTRAT Jacques-Olivier
HAMEL Jean-François
HINDRE François
JOUSSET-THULLIER Nathalie
LACOEUILLE Franck
LETOURNEL Franck
LIBOUAN Hélène
MABILLEAU Guillaume
MAY-PANLOUP Pascale

MESLIER Nicole
MOUILLIE Jean-Marc
PAPON Xavier
PASCO-PAPON Anne
PENCHAUD Anne-Laurence
PETIT Audrey
PIHET Marc
PRUNIER Delphine
SIMARD Gilles
TANGUY-SCHMIDT Aline
TRZEPIZUR Wojciech

AUTRES ENSEIGNANTS

AUTRET Erwan
BARBEROUSSE Michel
CHIKH Yamine
FISBACH Martine

Néphrologie
Hématologie - Transfusion
Pneumologie
Pédiatrie
Neurologie
Radiologie et imagerie médicale
Bactériologie - Virologie - Hygiène hospitalière
Hématologie - Transfusion

DISCIPLINES

Médecine Générale
Immunologie
Médecine interne
Médecine générale
Réanimation
Cardiologie
Hématologie - Transfusion
Cancérologie - Radiothérapie
Neurologie
Immunologie
Biologie cellulaire
Génétique
Médecine générale
Biologie moléculaire
Physiologie
Biostatistiques – Informatique médicale
Biophysique
Médecine légale et droit de la santé
Biophysique et médecine nucléaire
Biologie cellulaire
Histologie
Histologie - Embryologie - Cytogénétique
Biologie - Médecine du développement et de la reproduction
Physiologie
Philosophie
Anatomie
Radiologie et imagerie médicale
Sociologie
Médecine et santé au travail
Parasitologie - Mycologie
Biochimie - Biologie moléculaire
Biochimie - Biologie moléculaire
Hématologie - Transfusion
Pneumologie

DISCIPLINES

Anglais
Informatique
Economie - Gestion
Anglais

LETERTRE Elisabeth
O'SULLIVAN Kayleigh

Coordination ingénierie de formation
Anglais

**ATER (Assistants Enseignement
Supérieur et Recherche)**

DISCIPLINES

WAKIM Jamal

Biochimie - Biologie moléculaire

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Audrey POUTIER,

Déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Le 12 octobre 2017,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'POUTIER', with a horizontal line extending to the right.

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse, Madame Hélène Le Guillou-Guillemette, Praticien Hospitalier au laboratoire de virologie du CHU d'Angers. Pour votre encadrement, votre soutien et tous vos encouragements tout au long de ce travail. Pour vos précieux conseils, vos explications et le partage de vos connaissances sur ce domaine ; la biologie moléculaire qui m'était peu connu. Pour votre disponibilité et votre patience même à l'afflux de tous mes mails, un **GRAND MERCI**, ce fut un plaisir de travailler avec vous !

A ma codirectrice, Madame Véronique Apaire-Marchais, Professeur de virologie à la faculté de pharmacie d'Angers et Praticien Hospitalier. Pour votre réactivité et vos conseils, merci d'avoir pris de votre temps pour la relecture de ma thèse.

A Monsieur Matthieu Eveillard, Professeur de bactériologie-virologie à la faculté de pharmacie d'Angers et Praticien Hospitalier. Merci de me faire l'honneur d'accepter de présider ce jury.

A Madame Adeline Pivert, Ingénieur hospitalier au laboratoire de virologie du CHU d'Angers, pour la formation que vous m'avez apporté sur les techniques de biologie moléculaire et vos précieuses explications sur la partie technique de cette thèse. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions et d'accepter aujourd'hui de faire partie de mon jury.

A Monsieur Yves-Marie Vandamme, Infectiologue au SMIT d'Angers. Pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

A toute l'équipe du laboratoire de virologie du CHU d'Angers, pour m'avoir aidé lors de la réalisation des manipulations au laboratoire.

A Mademoiselle Brigitte Pech et Monsieur Sébastien Faure, responsables de la filière officine, pour vos enseignements et vos encouragements pendant toutes ces années.

A Madame Dominique Callerot, pharmacien titulaire maître de stage et toute son équipe, pour votre accueil, vos conseils et votre initiation à l'exercice officinal au cours de mes 6 mois de stage.

A mes copiiiiiiiiins mayennais, pour ce que vous êtes et ce que vous serez toujours à mes yeux, pour tous ces moments partagés, pour toutes ces idioties que vous racontez, merci d'être là. Malgré la distance et le temps qui passe les retrouvailles sont toujours aussi attendues !!!!

A mes copines pharma d'officine Cindy, Yasmina et Sophie, pour tous les moments qu'on a passés pendant ces 6 années, pour tous les potins toujours plus croustillants les uns que les autres, je vous dis **MERCI**.

A mes copains pharma, pour toutes ces soirées au Berthom, ces courses à pied, ces blagues à « deux balles », merci pour votre bonne humeur et votre joie de vivre.

A l'AG team, Clémence et Laure, pour cette amitié que je n'aurais au départ pas soupçonné et qui maintenant j'espère, durera de longues années.

A Anne et Bertrand, merci d'être toujours là pour nous, pour toutes ces petites attentions, ces bons petits plats et weekends passés au Mans. Pour votre soutien pendant ces études que vous connaissez bien, pour m'avoir accueilli aussi ces samedis matin dans votre pharmacie. Pour votre partage de ce beau métier que vous aimez tant. Merci pour TOUT, vous êtes ma deuxième famille.

Enfin et plus particulièrement,

A toi Didine, ma grande sœur, tu as toujours été un exemple pour moi. Ta réussite m'a encouragé, m'a motivé et aujourd'hui je suis fier de NOTRE réussite. Tes conseils avisés et tes avis bien tranchés m'ont toujours fait avancer.

A toi papa, pour tous ces appels que tu me passes, pour tous ces messages vocaux idiots que tu me laisses, pour tes notes d'humour et tes blagues pas drôles pour me détendre et me faire rire.

A toi maman, pour avoir toujours été la meilleure maman du monde, pour ta sagesse, ton calme et ta patience.

A tous les deux papa et maman, pour tout l'amour que vous m'avez toujours apporté. Pour nous avoir toujours fait passer en premier. Pour avoir toujours été présents dans les moments plus difficiles. Pour m'avoir permis de suivre les études de mon choix et avoir cru en moi jusqu'au bout. Sans vous, tout cela n'aurait pas été possible, je vous dois tout et vous en seriez éternellement reconnaissante.

A toi Alex, pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien. Pour le soutien et les encouragements incontestables dont tu as fait preuve tout au long de ce travail. Pour avoir supporté mon angoisse, mon mauvais caractère, mes baisses de moral et avoir toujours su trouver les mots justes pour m'encourager. Trouve dans ces quelques lignes la preuve de tout mon amour. J'ai hâte que nous soyons enfin tous les deux de bons **PHARMACIENS**.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS.....	1
ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT.....	6
REMERCIEMENTS.....	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	14
LEXIQUE DES ABREVIATIONS.....	15
LISTE DES ANNEXES	17
INTRODUCTION.....	18
PARTIE 1. INTRODUCTION GENERALE SUR LE VIH	20
I. Généralités sur le VIH	20
I.1. La découverte du virus	20
I.2. Taxonomie	20
I.3. Structure du virus.....	21
I.4. Organisation du génome viral.....	22
I.5. Cycle de réplication viral.....	23
I.6. Variabilité génétique.....	25
II. Epidémiologie	27
II.1. Les modes de transmission du virus.....	27
II.1.1. La transmission sexuelle.....	27
II.1.2. La transmission sanguine.....	27
II.1.3. La transmission materno-fœtale	29
II.2. Epidémiologie à l'échelle mondiale	30
II.3. Epidémiologie en France.....	31
II.3.1. Incidence.....	31
II.3.2. Prévalence.....	32
II.3.3. Mortalité	32
III. Physiopathologie de l'infection par le VIH	33
III.1. La primo-infection	33
III.2. La phase de latence clinique	34
III.3. Le stade SIDA.....	35
IV. Dépistage et diagnostic biologique du VIH.....	37
IV.1. Stratégies de dépistage.....	37
IV.1.1. Qui dépister ?	37
IV.1.2. Où se faire dépister et par qui ?.....	38

IV.2. Diagnostic sérologique de première intention	39
IV.2.1. Principe du dépistage sérologique.....	39
IV.2.2. Détection et quantification de l'antigène p24	41
IV.3. Diagnostic moléculaire et suivi de l'infection	42
IV.3.1. Quantification de l'ARN viral : charge virale.....	42
IV.3.2. Isolement du virus par culture.....	43
V. La prise en charge thérapeutique	43
V.1. Les traitements antirétroviraux	43
V.1.1. Les présentations combinées recommandées	45
V.1.2. Les principaux effets indésirables des antirétroviraux	45
V.1.3. Les interactions médicamenteuses des ARV.....	46
V.1.4. Le coût des traitements ARV	46
V.2. Stratégies thérapeutiques.....	47
V.2.1. Initiation d'un premier traitement antirétroviral	48
V.2.2. Prise en charge des situations d'échec virologique	52
V.2.3. Optimisation de traitement en situation de succès virologique	52
V.3. Le suivi thérapeutique des patients	53
V.3.1. Surveillance clinique	53
V.3.2. Surveillance biologique	53
V.3.3. Surveillance immuno-virologique	53
VI. La résistance aux antirétroviraux.....	54
VI.1. Définition de la résistance et mécanismes	54
VI.1.1. Définition de la résistance	54
VI.1.2. Notion de barrière génétique.....	54
VI.1.3. Mécanismes de la résistance	55
VI.2. Les tests de résistance	56
VII. Présentation et objectifs du projet	58
PARTIE 2. MATERIEL ET METHODES.....	60
I. Echantillons biologiques	60
II. Méthodes	60
II.1. Extraction de l'ADN proviral.....	60
II.2. Réaction de PCR	61
II.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	66
II.4. Purification des produits de la PCR nichée	67
II.5. Quantification de l'ADN	67
II.6. Séquençage.....	68
II.6.1. PCR de séquence	68

II.6.2. Purification des produits de la PCR de séquence	70
II.6.3. Migration électrophorétique	70
II.7. Analyse des chromatogrammes	70
PARTIE 3. RESULTATS DE L'ETUDE	72
I. Détermination des conditions expérimentales pour détecter l'ADN proviral	72
I.1. Détermination du volume d'élution lors de l'extraction de l'ADN et du volume d'extrait d'ADN à déposer pour la réaction de PCR	72
I.2. Détermination de la température d'hybridation des amorces	74
I.3. Détermination de la concentration en amorces	76
II. Validation du protocole sur les 18 échantillons	78
II.1. Amplification avec le protocole 1	79
II.2. Amplification avec le protocole 2 : élution sous 50µL	81
II.3. Amplification avec le protocole 3 : amorces utilisées en routine à Angers	83
II.4. Synthèse des résultats de l'amplification : bilan des 3 protocoles	84
III. Résultats du séquençage	84
III.1. Comparaison de la performance du séquençage à Angers et à Nantes	84
III.2. Comparaison des mutations de résistance identifiées	85
III.3. Comparaison des sous-types et tropismes	88
PARTIE 4. DISCUSSION	90
I. Les résultats de détermination des conditions expérimentales	90
I.1. Les conditions expérimentales sont-elles vraiment optimales ?	90
II. Les résultats de validation du protocole 1 sur les 18 échantillons	91
III. Les résultats du séquençage sur l'ADN proviral	92
III.1. Les limites du séquençage direct	92
III.2. Intérêts et limites du séquençage sur l'ADN proviral	92
III.3. Performance de la technique de séquençage	94
III.4. Les mutations de résistance identifiées	94
III.4.1. Mutations identifiées et données de la littérature	94
III.4.2. Comment expliquer les différences de résultats entre Angers et Nantes ?	97
III.5. Tropisme et sous-types du virus	100
IV. Conclusion du travail expérimental et pistes d'amélioration	101
PARTIE 5. LA PLACE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS LA PRISE EN CHARGE DU VIH	103
I. Rôle du pharmacien d'officine dans la prévention	103
I.1. Les outils de la prévention	103
I.2. Le dépistage	103
II. Rôle du pharmacien d'officine lors de la délivrance	105
II.1. Détecter les interactions médicamenteuses	105

II.2. Gérer les effets indésirables et donner des conseils associés	106
III. Rôle du pharmacien d'officine dans l'observance	108
III.1. Evaluer l'observance.....	108
III.2. Favoriser l'observance	109
III.3. Eduquer le patient	109
CONCLUSION.....	111
BIBLIOGRAPHIE	112
ANNEXES.....	120

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Organisation structurale du VIH
- Figure 2** : Organisation du génome proviral du VIH-1
- Figure 3** : Cycle viral du VIH
- Figure 4** : Relations phylogénétiques entre les lignées VIH-1, SIVcpz et SICgor
- Figure 5** : Incidence des nouvelles infections à VIH entre 1980 et 2015 par régions mondiales
- Figure 6** : Evolution naturelle de l'infection VIH
- Figure 7** : Algorithme de dépistage du VIH chez les adultes et les enfants de plus de 18 ans
- Figure 8** : Chronologie de positivité des tests de dépistage en fonction de l'évolution des marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par le VIH-1
- Figure 9** : Options recommandées pour l'initiation d'un premier traitement antirétroviral
- Figure 10** : Principales étapes de réalisation des génotypes de résistance
- Figure 11** : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger
- Figure 12** : Photo du gel avec variation du volume d'élution et du volume de dépôt
- Figure 13** : Photo du gel après PCR effectuée en même temps pour les 2 échantillons
- Figure 14** : Photo du gel avec une température d'hybridation de 55°C et 57°C en 1^{ère} PCR
- Figure 15** : Photo du gel avec une température d'hybridation de 59°C en 1^{ère} PCR
- Figure 16** : Photo du gel avec les différentes concentrations en amorces en 2^{ème} PCR pour les gènes Protéase et Réverse Transcriptase
- Figure 17** : Photo du gel avec les différentes concentrations en amorces en 2^{ème} PCR pour les gènes Intégrase et gp120
- Figure 18** : Photo du gel avec utilisation des conditions « optimales » pour les échantillons E1 à E4 (essai n°1)
- Figure 19** : Photo du gel lors de l'essai n°2 pour le gène Protéase
- Figure 20** : Photo du gel lors de l'essai n°3
- Figure 21** : Photo du gel lors du protocole 2 avec un volume d'élution de 50µL pour les gènes Protéase et Réverse Transcriptase
- Figure 22** : Photo du gel lors du protocole 2 avec un volume d'élution de 50µL pour les gènes Intégrase et gp120
- Figure 23** : Photo du gel après utilisation des amorces de routine lors du protocole 3
- Figure 24** : Synthèse des mutations de résistance aux INTI
- Figure 25** : Synthèse des mutations de résistance aux INNTI
- Figure 26** : Synthèse des mutations de résistance aux IP
- Figure 27** : Synthèse des mutations de résistance aux INI

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Médicaments antirétroviraux commercialisés d'après le rapport Morlat (septembre 2016)
- Tableau 2** : Bilan paraclinique initial pré-thérapeutique d'un adulte infecté par le VIH
- Tableau 3** : Liste des amorces utilisées par le CHU de Nantes
- Tableau 4** : Liste des amorces de routine utilisées par le CHU d'Angers
- Tableau 5** : Composition du mix de PCR
- Tableau 6** : Programme et profils de température utilisé pour les PCR
- Tableau 7** : Composition du mix pour la PCR de séquence
- Tableau 8** : Programme et profils de température utilisé pour les PCR
- Tableau 9** : Résultats de l'amplification pour les 18 échantillons après les 3 protocoles expérimentaux
- Tableau 10** : Comparaison des résultats du séquençage des 18 échantillons à Angers et à Nantes
- Tableau 11** : Comparaison des mutations de résistances identifiées à Angers et à Nantes
- Tableau 12** : Synthèse des résultats d'interprétation des mutations de résistance
- Tableau 13** : Comparaison des sous-types et tropismes identifiés à Angers et à Nantes
- Tableau 14** : Origine des différences d'interprétation ayant un impact clinique. Le centre où est trouvée la différence est identifié (A) : Angers et (N) : Nantes.

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

3TC	Lamivudine
3TC/FTC	Lamivudine/emtricitabine
ABC	Abacavir
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AES	Accident d'Exposition au Sang
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
ANRS	Agence Nationale de Recherche contre le SIDA et les hépatites
ARN	Acide Ribonucléique
ARV	Antirétroviraux
ATV	Atazanavir
BET	Bromure d'Ethidium
CDS	Centers for Diseases Control
CeGIDD	Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des infections par le virus de l'immunodéficience humaine, les hépatites virales et les infections sexuellement transmissibles
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CMV	Cytomégalovirus
CNR	Centre National de Référence sur la résistance aux antirétroviraux
CRF	Circulating Recombinant Form
CV	Charge Virale
dATP	déoxyAdénosine TriPhosphate
dCTP	déoxyCytidine TriPhosphate
ddI	Didanosine
ddNTP	Didésoxyribonucléotides Triphosphates
d4T	Stavudine
DFA	Départements Français d'Amérique
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
dGTP	déoxyGuanosine TriPhosphate
dNTP	Désoxyribonucléotides
DRV	Darunavir
DTG	Dolutégravir
dTTP	déoxyThymidine TriPhosphate
EDTA	Ethylène-Diamine-Tétraacétique Acide édétique
EFV	Efavirenz
EHPAD	Etablissement Hébergeant des Personnes Agées Dépendantes
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETP	Education Thérapeutique du Patient
ETR	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FPV	Fosamprénavir
FTC	Emtricitabine
HAS	Haute Autorité de Santé
HDL	High Density Lipoprotein
HPST	Hôpital Patient Santé Territoire

HPV	Papillomavirus
HSH	Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes
IDV	Indinavir
INI	Inhibiteur d'Intégrase
INNTI	Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
INI	Intégrase
INTI	Inhibiteur Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IP	Inhibiteur de Protéase
IST	Infection Sexuellement Transmissible
LDL	Low Density Lipoprotein
LPV	Lopinavir
LTR	Long Terminal Repeat
NFS	Numération Formule Sanguine
NFV	Nelfinavir
NVP	Névirapine
OFDT	Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
ONUDC	Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime
PPI	Pour Préparation Injectable
PR	Protéase
PVVIH	Personnes Vivant avec le VIH
RAL	Raltégravir
RPV	Rilpivirine
RT	Réverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SQV	Saquinavir
TAMs	Thymidine Analogue Mutations
TBE	Tris Borate EDTA
TDF	Ténofovir
TME	Transmission Mère-Enfant
TPHA	Treponema Pallidum Hemagglutinations Assay
TPV	Tipranavir
TROD	Tests Rapides d'Orientation Diagnostique
UDI	Usagers de Drogues Injectables
UV	UltraViolet
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZDV	Zidovudine
γGT	Gamma Glutamyl Transpeptidase

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 - Liste d'abréviation des acides aminés

ANNEXE 2 - Mutations majeures de résistance aux antirétroviraux

ANNEXE 3 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INTI

ANNEXE 4 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INNTI

ANNEXE 5 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux IP

ANNEXE 6 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INI

ANNEXE 7 - Mutations de résistance aux INTI identifiées à Angers et à Nantes

ANNEXE 8 - Mutations de résistance aux INNTI identifiées à Angers et à Nantes

ANNEXE 9 - Mutations de résistance aux IP identifiées à Angers et à Nantes

ANNEXE 10 - Mutations de résistance aux INI identifiées à Angers et à Nantes

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été identifié pour la première fois en 1983 par l'équipe française des Pr Montagnier et Barré-Sinoussi. [1] Son implantation dans la population humaine a pour origine plusieurs passages de barrière d'espèces de virus SIV (Simian Immunodeficiency Virus) de primates d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale. La gravité de l'infection par le VIH est liée au lymphotropisme du virus qui conduit à une destruction du système immunitaire progressivement et au décès par infections opportunistes en l'absence de traitement antirétroviral. La transmission interhumaine du virus s'effectue par voie sexuelle, sanguine ou materno-fœtale. Cette infection virale a touché environ 36,7 millions de personnes dans le monde en 2015. D'après les données du rapport de l'ONUSIDA (agence spécialisée de l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour lutter contre la pandémie de VIH/SIDA), sur l'épidémie mondiale de SIDA 2016, 2 millions de personnes ont été nouvellement infectées par le virus en 2015. [2] Il constitue actuellement un véritable problème de santé publique puisqu'il a été responsable de plus d'un million de décès dans le monde en 2015.

La communauté internationale s'est engagée pour faire avancer la riposte contre le SIDA. Celle-ci s'est marquée par la mise en place de mesures de prévention des risques de contamination, l'amélioration de l'offre de dépistage et l'augmentation de l'accès à la thérapie antirétrovirale. Le plan mondial 90/90/90 développé par l'ONUSIDA a pour objectif d'ici à 2020 d'atteindre respectivement des taux de 90% de patients vivants avec le VIH dépistés, traités et dont la charge virale est durablement supprimée. [3] Cependant, le diagnostic reste encore tardif puisqu'en 2014, 43% des découvertes de séropositivité étaient tardives. [2] Or, même si les traitements actuels ne sont pas capables d'éradiquer le virus, ils permettent d'améliorer nettement la qualité de vie des sujets infectés et d'empêcher l'évolution de l'infection vers le stade SIDA.

Le VIH est un rétrovirus qui possède un génome très complexe. Son mécanisme de réplication, lui confère une forte variabilité génétique. Ainsi, plusieurs souches virales (ou quasi-espèces) circulent chez un même individu. L'administration d'un traitement antirétroviral peut alors induire la sélection de variants viraux résistants minoritaires qui conduiront à l'échec thérapeutique.

Pour éviter cette situation d'échec thérapeutique et aider les cliniciens dans leur choix thérapeutique, des recommandations internationales ont été mises en place. Avant l'initiation d'une thérapie, des tests génotypiques de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux doivent être

effectués en laboratoire de biologie. Ils consistent à étudier les gènes du virus codant pour les protéines cibles des traitements. L'identification des mutations à l'origine de résistance se fait par séquençage de l'Acide Ribonucléique (ARN) viral plasmatique du VIH-1.

Chez les patients en succès virologique, une optimisation de traitement est souvent proposée mais elle doit être précédée d'un test génotypique de résistance. Or, la charge virale plasmatique est devenue indétectable. Certains laboratoires se sont alors orientés vers le séquençage de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) proviral du VIH-1 pour pallier à cette situation.

Le laboratoire de virologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) d'Angers réalise actuellement le génotypage uniquement à partir de l'ARN plasmatique en routine contrairement au CHU de Nantes, qui dispose aussi de la technique sur l'ADN proviral. Le CHU d'Angers avait donc le projet de mettre au point la technique sur l'ADN proviral puis, de la tester sur l'ARN plasmatique pour qu'une méthode unique adaptée aux deux matrices soit performante et utilisable quelle que soit la charge virale plasmatique du patient.

L'objectif de cette thèse, est de décrire la mise au point de la technique que nous avons utilisé au CHU d'Angers, depuis l'extraction de l'ADN proviral à partir de 18 échantillons de sang total, jusqu'à la réalisation du séquençage. Dans un second temps, les résultats obtenus seront présentés et comparés à ceux envoyés par Nantes pour les mêmes échantillons. Enfin, nous discuterons ces résultats et jugerons de la possibilité de mettre en place la technique en routine au laboratoire de virologie du CHU d'Angers.

Une autre partie de notre travail sera consacrée à la place du pharmacien d'officine dans la prise en charge du patient infecté par le VIH. En effet, l'évolution des stratégies thérapeutiques permet aujourd'hui un contrôle de l'infection virale chez près de 90% des patients traités, et une espérance de vie qui a quasiment rejoint celle de la population générale. Il s'agit désormais de prendre en charge des patients atteints d'une infection chronique avec un traitement à vie. Dans ce contexte, nous nous attacherons à discuter notamment du rôle que le pharmacien d'officine doit assurer en termes de prévention de la transmission de cette IST, au cours de la délivrance des antirétroviraux et enfin de la participation active de ce professionnel de santé dans l'aide à l'observance.

PARTIE 1. INTRODUCTION GENERALE SUR LE VIH

I. Généralités sur le VIH

I.1. La découverte du virus

Le VIH, est un agent infectieux responsable du SIDA « *syndrome d'immunodéficience acquise* ». En 1981, les premiers cas sont décrits aux Etats-Unis. A cette époque, le terme de SIDA n'est pas encore utilisé. On parle de « *gay syndrome* » puisqu'il est identifié chez des homosexuels.

Le virus apparaît en France en 1982. Des recherches sont alors lancées par l'Institut Pasteur à Paris. Elles consistent à mettre en culture des cellules ganglionnaires issues d'une biopsie d'un patient atteint de « *lymphadénopathie généralisée* » et à les observer au microscope. En effet, les chercheurs ont remarqué que les patients qui développent cette maladie, voient leur taux de lymphocytes CD4 diminuer considérablement avant de disparaître complètement. Le but, est de rechercher la présence de rétrovirus par la détection d'une activité transcriptase inverse. Cette activité est bien détectée, mais elle est suivie par un phénomène de mort cellulaire. Il s'agit de la première observation de l'effet cytopathogène du virus.

La première description du virus est publiée en 1983 dans la revue Science par les Pr Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier, qui recevront le prix Nobel de Médecine en 2008 pour leur découverte. [1] Cependant, il faut encore démontrer le lien de causalité entre le virus et le SIDA. [4]

I.2. Taxonomie

Le VIH, est un virus à ARN qui appartient à la famille des *Retroviridae* (rétrovirus), à la sous famille *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus*. [5] Cette famille, recouvre toute particule virale possédant un génome à ARN monocaténaire et une transcriptase inverse, enzyme capable de rétrotranscrire l'ARN en ADN. Selon la pathogénie des rétrovirus, on distingue trois sous-familles dont celle des *Lentivirus*, responsables de maladies à évolution lente. [6]

I.3. Structure du virus

Le VIH, se présente sous forme de particules virales sphériques représentée sur la figure 1, d'un diamètre variant de 100 à 120nm, dont le génome est complexe. Il s'agit d'un virus constitué d'une enveloppe externe, composée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte infectée. Dans cette enveloppe externe constituant la membrane virale, sont insérées plusieurs glycoprotéines. La gp120, une glycoprotéine de surface apparente ancrée au virus par l'intermédiaire de l'interaction avec une autre glycoprotéine transmembranaire, la gp41.

A l'intérieur de la particule virale, l'enveloppe externe est tapissée par une matrice protéique composée de la protéine p17.

Au centre du virus, entourée de la matrice protéique, se trouve une capside de forme conique aussi appelée « core » et composée de la protéine p24. Cette capside virale, contient deux copies du génome viral, un ARN monocaténaire, associées à la nucléocapside composée de la protéine p7. Elle contient également trois enzymes virales essentielles au cycle de réplication du virus : la protéase, la reverse transcriptase et l'intégrase.

Enfin, on retrouve quelques protéines dites « accessoires ». [7]

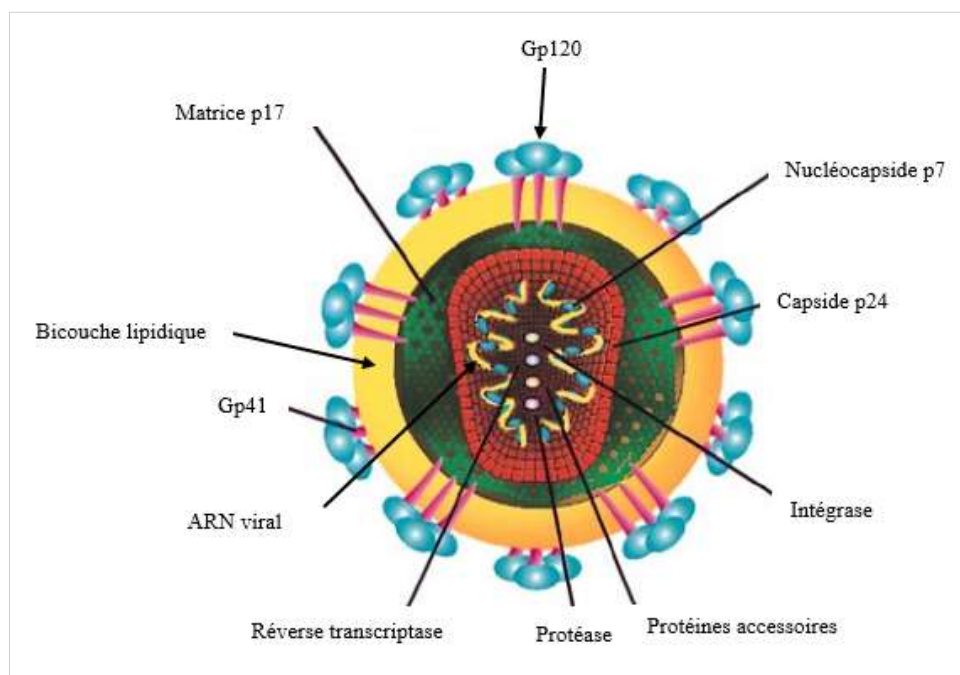


Figure 1 : Organisation structurale du VIH [7]

I.4. Organisation du génome viral

Le génome du VIH-1, se compose de deux brins d'ARN identiques de 9.2kb (kilobase). On y distingue au moins trois régions codantes appelées *gag*, *pol* et *env*.

Le gène *gag* code pour les protéines internes de structure du virus : la matrice protéique, la capside et la nucléocapside.

Le gène *pol*, code pour les enzymes virales nécessaires à la réplication du virus : protéase, reverse transcriptase et intégrase.

Le gène *env*, code pour les protéines de surface formant l'enveloppe du virus : la gp120 et la gp41.

Le génome à ARN simple brin, est rétrotranscrit en ADN double brin au moment de l'entrée du virus dans la cellule. A chaque extrémité de l'ADN viral, se trouve une séquence de taille variable Long Terminal Repeat (LTR), qui permet l'intégration de l'ADN sous forme d'un provirus dans le génome de la cellule hôte. Cette séquence, contient les éléments promoteurs nécessaires à l'expression des gènes.

Le génome viral, illustré par la figure 2, est très complexe. En effet, en plus des trois gènes rétroviraux classiques décrits précédemment, il existe de nombreux gènes dits « accessoires » dénommés : *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx* et *nef*, situés entre les gènes *pol* et *env*. Pour la plupart, ces gènes supplémentaires sont impliqués dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales. [6] [8] [9]

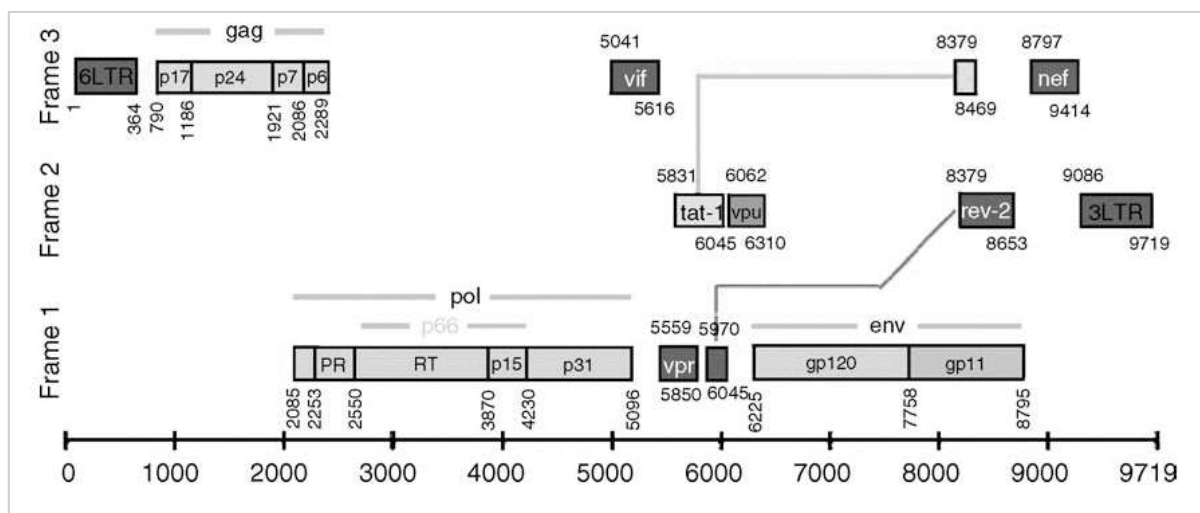


Figure 2 : Organisation du génome proviral du VIH-1 [9]

I.5. Cycle de réplication viral

Le cycle réplcatif du VIH-1 se compose de plusieurs étapes communes à tous les rétrovirus. Sa connaissance, est essentielle pour comprendre la physiopathologie de l'infection VIH. Mais surtout, chacune des étapes est potentiellement une cible pour une thérapie antirétrovirale. [6]

Etape 1 : Attachement et pénétration du virus dans la cellule

La première étape de l'infection par le virus, correspond à son adsorption à la surface de la cellule cible suivie de sa pénétration dans la cellule. Les cellules cibles du virus sont les cellules possédant à leur surface le récepteur CD4. Elles sont principalement des cellules du système immunitaire : lymphocytes T CD4⁺, monocytes/macrophages. Mais également des cellules folliculaires dendritiques ou des cellules de Langerhans. [8]

L'attachement du virus à sa cellule cible se fait par l'interaction entre la glycoprotéine gp120 du virus et le récepteur CD4 de la cellule. Cette interaction est à l'origine d'un changement de conformation des deux molécules. Ce changement permet alors l'accès de la glycoprotéine gp41 aux corécepteurs transmembranaires CCR5 ou CXCR4 de la cellule. La fusion entre la membrane du virus et celle de la cellule cible s'effectue et la capside virale peut pénétrer dans le cytoplasme de la cellule. [10]

Etape 2 : Rétrotranscription

Dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN viral subit une étape de transcription inverse grâce à la transcriptase inverse virale, capable de rétrotranscrire l'ARN génomique viral monocaténaire en ADN complémentaire bicaténaire. Au cours de cette réaction, des erreurs de copies peuvent être effectuées par l'enzyme qui est peu fidèle. Ce sont ces erreurs qui sont à l'origine de la variabilité génétique du VIH. [6] [9]

Etape 3 : Intégration

L'ADN complémentaire bicaténaire présent dans le cytoplasme de la cellule cible, est importé à l'intérieur du noyau de cette cellule puis est intégré au sein de son génome grâce à l'action de l'intégrase virale. Le génome viral intégré est appelé ADN proviral. [11]

Etape 4 : Transcription

L'ADN proviral est transcrit en ARN messagers viraux dont l'ARN génomique, par l'enzyme cellulaire ARN polymérase ADN dépendante II. Ces ARN messagers (ARNm), sont transportés du noyau vers le cytoplasme de la cellule pour la traduction. [7]

Etape 5 : Traduction et maturation

La protéine *rev* module le transport des ARNm vers le cytoplasme. En effet, les ARNm multi-épissés sont restreints et sont traduits en protéines régulatrices. Cela, au profit des ARNm peu ou non épissés qui sont traduits en protéines de structure correspondant au gène *env* et au gène *gag-pol*.

Le gène *env* est donc traduit en un précurseur polyprotéique, gp160, dans le réticulum endoplasmique qui gagne l'appareil de golgi où il sera clivé par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe gp120 et gp41.

Le gène *gag-pol*, est d'abord traduit pour donner les polyprotéines Gag et Gag-Pol. La polyprotéine Gag est clivée par la protéase virale et permet la formation des protéines structurales internes du virus. En revanche, le clivage de la polyprotéine Gag-Pol par la protéase, permet la formation des trois enzymes : protéase, reverse transcriptase et intégrase. [12]

Etape 6 : Assemblage et bourgeonnement

Après la traduction, les protéines d'enveloppe et de structure interne, les trois enzymes et l'ARN génomique, migrent vers la membrane cellulaire et s'assemblent pour former une particule virale infectieuse mature. Cette particule peut alors bourgeonner à la surface de la cellule et être libérée dans le milieu extracellulaire pour aller infecter une nouvelle cellule cible. [9] [12]

La figure 3 résume les étapes du cycle viral.

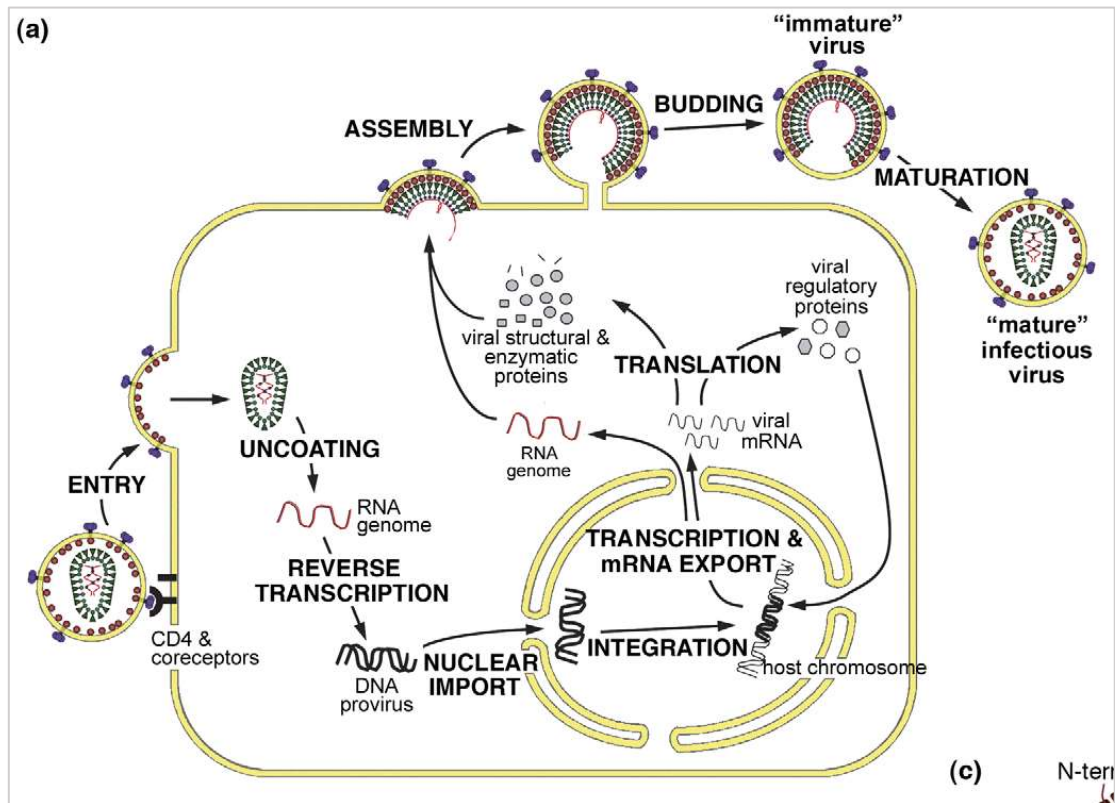


Figure 3 : Cycle viral du VIH [13]

I.6. Variabilité génétique

Les virus de l'immunodéficience humaine sont génétiquement très variables. Ils sont classés en deux types : VIH-1 et VIH-2, eux-mêmes subdivisés en groupes correspondant aux différents passages inter-espèces. En effet, douze transmissions du singe à l'homme ont été répertoriées dont quatre à l'origine des groupes du VIH-1 et huit pour le VIH-2. [14]

VIH-1 :

Le VIH-1, principalement responsable de la pandémie du SIDA, est le plus proche des SIVcpz et SIVgor, deux rétrovirus retrouvés respectivement chez les chimpanzés et les gorilles de l'Ouest de l'Afrique Centrale. Les relations phylogénétiques entre ces différentes lignées sont représentées sur la figure 4.

Il existe donc quatre groupes de VIH-1 :

- Le groupe M (major)
- Le groupe O (Outlier)
- Le groupe N (non-M, non-O)

- Le groupe P. [15] [16]

Parmi ces quatre groupes, seul le VIH-1 groupe M, s'est diffusé à l'échelle mondiale et est aujourd'hui, le groupe majoritaire. En effet, il est divisé en neuf sous-types (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) et, plus de cinquante-cinq formes recombinantes entre ces sous-types ont été identifiées, appelées Circulating Recombinant Form (CRF).

Les différents sous-types ou CRF du VIH-1 groupe M, sont inégalement répartis dans le monde. Le sous-type B est à l'origine de la pandémie aux Etats-Unis, en Europe et en Australie. En revanche, les autres sous-groupes, regroupés sous la dénomination de VIH- non B, sont principalement retrouvés sur le continent africain.

Le groupe N, a été retrouvé chez quelques individus au Cameroun et le groupe O, est à l'origine de quelques milliers d'infection en Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest. Quant au groupe P, récemment découvert, il a été identifié chez deux individus originaires du Cameroun. [17]

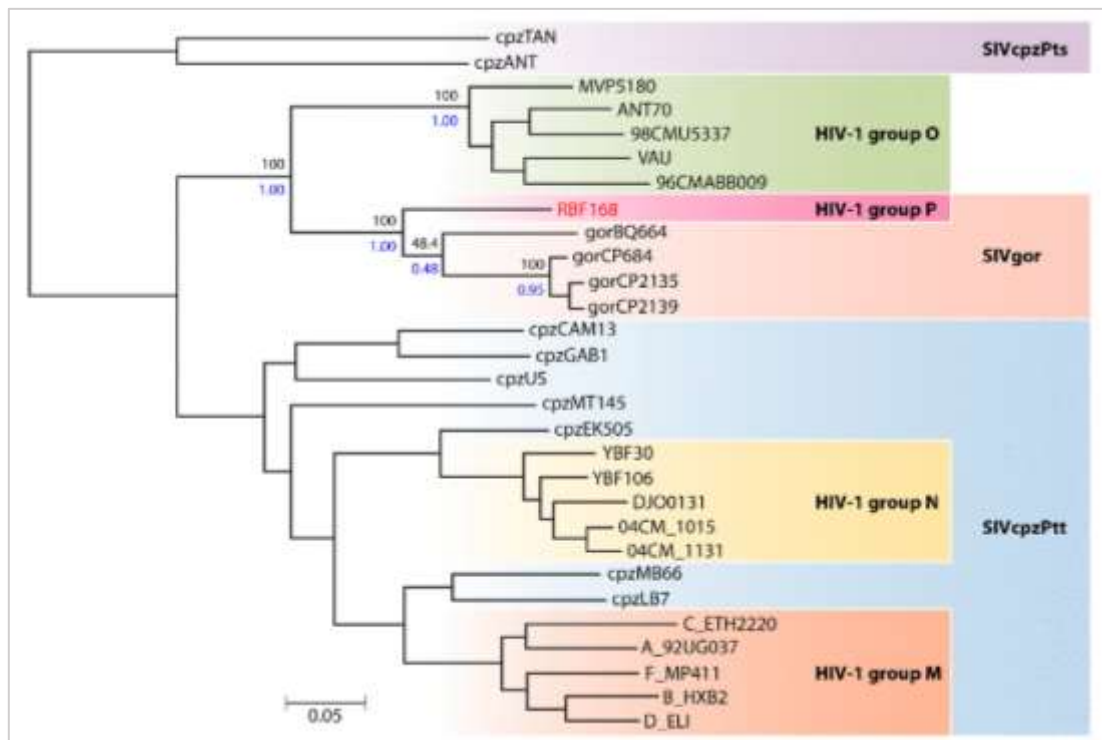


Figure 4 : Relations phylogénétiques entre les lignées VIH-1, SIVcpz et SIVgor [18]

VIH 2 :

Le VIH-2, a pour origine, les SIVsmm présents chez les mangabés enfumés d'Afrique de l'Ouest. On y observe également une très grande diversité génétique puisqu'il est constitué d'au moins huit groupes viraux (A à H). Contrairement au VIH-1, l'épidémie est limitée au continent Africain et le virus est moins pathogène et moins transmissible que le virus pandémique, VIH-1 M. [16]

Ce phénomène de variabilité génétique, s'explique par l'enzyme reverse transcriptase qui effectue des erreurs de rétrotranscription. A chaque cycle, le taux de mutation est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} erreurs d'incorporation par nucléotide. Ces erreurs, associées à une vitesse importante de réplication du virus constituent un obstacle à l'élaboration d'un vaccin efficace. De plus, cette diversité génétique est à l'origine de nombreuses résistances aux traitements antirétroviraux. [19] [20]

II. Epidémiologie

II.1. Les modes de transmission du virus

II.1.1. La transmission sexuelle

Le mode de transmission le plus répandu (85 % à 90%) de l'infection par le VIH dans le monde est sexuel. [21] Il se produit lors de rapports sexuels non protégés. La contamination se fait par l'intermédiaire des muqueuses vaginales et anales lorsqu'elles sont en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus. La transmissibilité peut être augmentée par certains facteurs de risques tels que les rapports lors des règles, les infections génitales (herpès, syphilis...), la période de primo-infection ou le stade sida. [22]

En France, les populations les plus touchées par cette transmission sont les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH). En effet, ils représentent 40 à 50 % des nouvelles contaminations chaque année. Ensuite, viennent les hétérosexuels d'origine étrangère. Au sein de cette population, ce sont les femmes qui sont particulièrement concernées avec 60 % des nouvelles contaminations chaque année. [23]

Actuellement, l'utilisation des préservatifs masculins et féminins reste le seul moyen fiable de protection contre le VIH.

II.1.2. La transmission sanguine

Plusieurs modes de contamination sanguine par le VIH sont observés :

- Utilisation de drogues injectables
- Utilisation de produits extraits du sang non dépistés
- Contamination professionnelle du personnel de santé. [22]

Les usagers de drogues injectables (UDI) représentent une population fortement à risque de transmission du VIH. D'après le rapport mondial sur les drogues de 2016 publié par l'Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime (ONUDC), plus de 29 millions de consommateurs de drogues dans le monde souffriraient de troubles liés à cet usage. Parmi eux, 12 % pratiquent l'injection dont 14% vivent avec le VIH. [24]

L'ONUSIDA, coparrainant de l'ONUDC depuis 1999, estime qu'environ 10% des nouvelles infections à VIH dans le monde sont imputables à la consommation de drogues injectables et qu'elle deviendrait même le principal mode de transmission du virus dans certaines régions. [24]

En France, une politique de réduction des risques liés à l'usage de drogues a été mise en place en 1993 suite aux estimations de l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT). Grâce à la mise en place de cette politique, plusieurs outils de réduction des risques ont vu le jour :

- Libéralisation de la vente des seringues stériles en pharmacie (Stéribox®)
- Mise en place de programmes d'échanges de seringues
- Accès aux traitements de substitution aux opiacés (buprénorphine et méthadone). [25]

Le VIH peut également se transmettre par contact avec du sang contaminé. Notamment, au cours de transfusions sanguines. C'est pourquoi, à la suite de l'affaire du sang contaminé en 1985, la France a débuté une surveillance épidémiologique des donneurs de sang. Cela s'est traduit par la mise en place du dépistage obligatoire du VIH dans les dons du sang par la détection des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH2. [26] La surveillance s'est ensuite élargie par la qualification de tous les dons qu'il s'agisse d'organes, de lait, de tissus. Ce système s'est mis en place grâce à la mission de biovigilance de l'agence de biomédecine. Elle consiste à « surveiller les risques liés à l'utilisation à des fins thérapeutiques d'éléments et produits issus du corps humain tels les organes, les tissus, les cellules et le lait maternel à usage thérapeutique ». [27]

Enfin, les professionnels de santé sont largement exposés au risque de transmission à la suite d'Accidents d'Exposition au Sang (AES). Un AES, se définit par « tout contact avec du sang ou un liquide biologique contenant du sang et comportant, soit une effraction cutanée, soit une projection sur une muqueuse ou sur une peau lésée. » [28] L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a rapporté que le risque moyen de transmission du VIH après une exposition percutanée au sang d'un patient infecté, était de 0,3%. En France, au 31 décembre 2009, 14 cas prouvés de séroconversions professionnelles VIH ont été recensés depuis l'année 1985. La dernière séroconversion a été rapportée en 2004. [29]

II.1.3. La transmission materno-fœtale

On parle de Transmission de la Mère à l'Enfant (TME), lorsqu'une mère séropositive transmet le VIH à son enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les taux de transmissions varient de 15 à 45% en l'absence d'intervention. [30]

Sans cette intervention, le risque de transmission à l'accouchement est d'environ 25%, mais au cours de la grossesse, celle-ci se produit souvent après 36 semaines. En ce qui concerne le taux de transmission au cours de l'allaitement, il est d'environ 8 à 9 % par an et survient principalement au cours de la quatrième semaine d'allaitement. Dans les pays où l'allaitement prolongé se pratique couramment en l'absence de ressources suffisantes, le taux de transmission peut atteindre jusqu'à 40%.

Cependant, une alimentation mixte augmenterait davantage le risque de transmission que l'allaitement exclusif. [31]

Pour limiter au maximum ce mode de transmission, l'OMS a mis en place un large programme de prévention. Elle recommande, que toute femme enceinte ou allaitante séropositive éligible au traitement, reçoive au long cours, une trithérapie antirétrovirale. Elle doit être débutée le plus tôt possible après le diagnostic et poursuivie après l'accouchement. La trithérapie préférentiellement utilisée, associe deux Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI), zidovudine et lamivudine, à un Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI), la névirapine. Quant au nourrisson, il doit être traité par de la névirapine (une fois par jour) ou par de la zidovudine (2 fois par jour) dès la naissance et jusqu'à 4 ou 6 semaines. [32]

Le traitement doit respecter des règles d'efficacité et de tolérance, il doit tenir compte des spécificités de la grossesse. Les experts français recommandent en première intention, une trithérapie comportant deux INTI et un Inhibiteur de Protéase (IP) associé au ritonavir. Ils ne recommandent pas les INNTI en première intention si d'autres choix sont possibles. [33]

Selon le rapport ONUSIDA de 2012, l'accès à la trithérapie antirétrovirale a permis une baisse de 43% des nouvelles infections constatées chez les enfants depuis 2003. Dans les pays à revenu faible et intermédiaire, le taux de couverture des traitements antirétroviraux efficaces contre la TME a atteint 62% en 2012. Cette couverture est quasiment universelle dans les pays à revenu élevé. [34]

II.2. Épidémiologie à l'échelle mondiale

Depuis le début de l'épidémie, 78 millions de personnes ont été infectées par le virus et 35 millions sont décédées de maladies liées au SIDA.

En 2015, 36,7 millions de personnes vivaient avec le VIH. Ce chiffre ne cesse d'augmenter puisque davantage de personnes dans le monde ont désormais accès la thérapie antirétrovirale. En effet, selon ONUSIDA, en 2015, 17 millions de personnes avaient accès à ce traitement. Malgré une diminution du nombre de nouvelles infections, on constate chaque année que ce nombre reste élevé. En 2015, environ 2,1 millions de personnes ont été nouvellement infectées et 1,1 millions sont décédées de maladies liées au SIDA.

Parmi les personnes vivant avec le VIH, 17,1 millions ignorent être atteintes par le virus et devraient être orientées par les services de dépistage du VIH. [35]

Dans le monde, il existe de grandes disparités entre les différentes régions concernant la dynamique de l'épidémie mais aussi les progrès accomplis dans la lutte contre le VIH. En effet, l'Afrique sub-saharienne demeure la région mondiale la plus touchée par l'épidémie. Toutefois, le dépistage et la prise en charge tardive de l'infection restent un point commun à l'ensemble de la population mondiale.

Une large étude épidémiologique a été menée en 2015 par the Global Burden of Disease, incluant 195 pays de 1980 à 2015. [36] D'après cette étude, depuis le pic d'incidence à 3,3 millions de nouvelles infections en 1997, l'incidence annuelle reste relativement constante depuis 2005. En revanche, le nombre de décès a diminué, il atteignait 1,8 millions en 2005 contre 1,2 millions en 2015.

L'évolution du nombre de nouvelles infections à VIH depuis 1980 par régions mondiales est représentée sur la figure 5. [36]

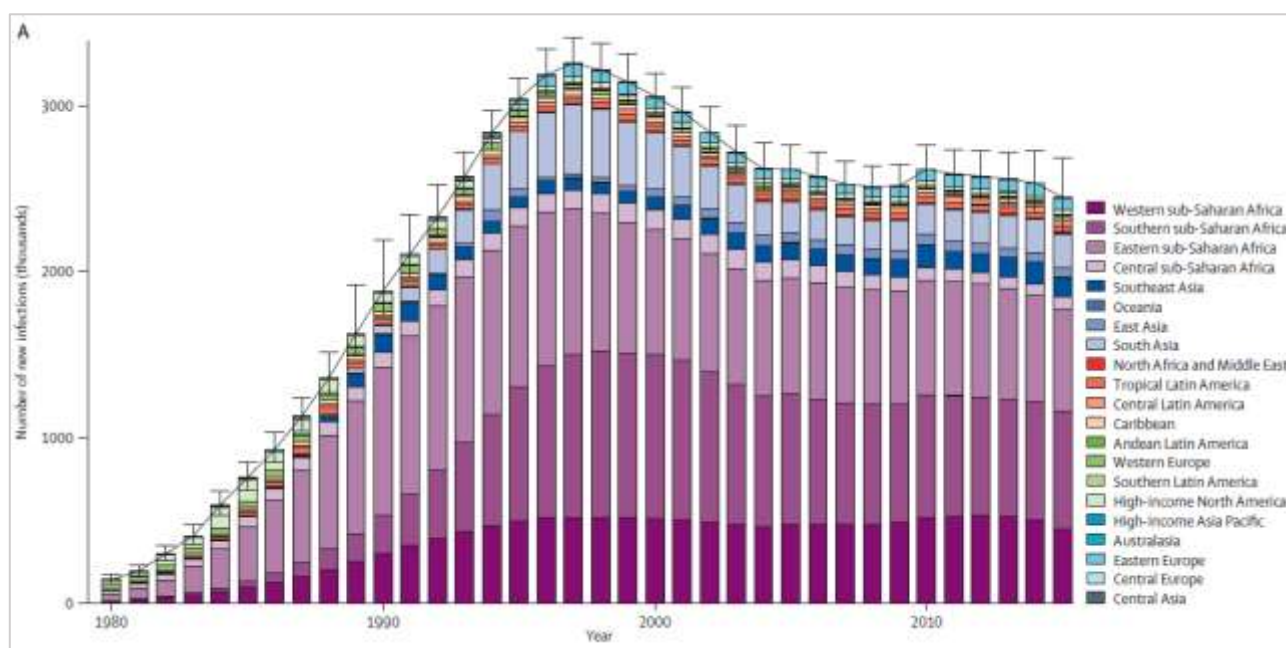


Figure 5 : Incidence des nouvelles infections à VIH entre 1980 et 2015 par régions mondiales [36]

II.3. Epidémiologie en France

II.3.1. Incidence

En épidémiologie, l'incidence correspond au « nombre de nouvelles personnes infectées par le VIH par unité de temps dans une entité géographique donnée. » Le rapport Morlat de 2013, estime que chaque année, entre 7000 et 8000 personnes sont nouvellement infectées par le VIH en France. Au sein de cette population, 40 à 50 % des nouvelles contaminations se produisent chez les HSH. [37]

Des estimations réalisées par l'InVS pour les années 2009 et 2010, indiquent que les départements français les plus touchés sont les Départements Français d'Amérique (DFA), la Guyane et l'Ile-de-France. [38]

Parmi les découvertes de séropositivité en 2014, 31 % sont des femmes. Les personnes de 25 à 49 ans sont représentées à 69 %, contre 20 % pour les plus de 50 ans et 11 % pour les moins de 25 ans. Cette proportion par tranche d'âge n'a pas évolué de façon significative depuis 2003. En revanche, on constate une diminution progressive de la proportion des découvertes au stade SIDA, de 20 % en 2003 à 11 % en 2014. [39]

II.3.2. Prévalence

Contrairement à l'incidence, la prévalence représente le pourcentage ou le nombre de Personnes Vivant avec le VIH (PVVIH) à un moment donné. Ce chiffre est estimé à 149 900 en 2010 pour la population française. Dans cette population, la prise en charge est très variable. En effet, on estime qu'en 2010 :

- « 81 % des PVVIH sont diagnostiquées, avec un pourcentage plus important chez les UDI
- 74 % sont dans le système de soins
- 60 % reçoivent des antirétroviraux depuis au moins 6 mois
- 52 % ont une charge virale contrôlée. » [23]

Malgré cela, 28800 personnes ignorent encore leur statut. [37]

L'enquête VESPA 2, réalisée en 2011 a été conçue pour rendre compte de la diversité de la population vivant avec le VIH sur le territoire national. [40] En Métropole, en 2011, la répartition est la suivante :

- « 39 % de PVVIH sont des HSH
- 11 % sont des UDI
- 24 % sont des immigrés originaires d'Afrique subsaharienne
- 26 % sont d'autres catégories de patients et en majorité des personnes infectées par rapports hétérosexuels. » [37] [40]

II.3.3. Mortalité

Le développement ces dernières années des traitements antirétroviraux, a largement contribué à augmenter l'espérance de vie des PVVIH. Le taux de mortalité dans cette population a diminué, même si celui-ci reste supérieur à celui de la population générale. Les dernières données de l'OMS en 2012, estiment le nombre de décès dus au VIH à 0,7 pour 100000 patients. [41]

Pour permettre de mieux définir les priorités de prévention et de soins curatifs, l'enquête Mortalité 2010, réalisée par l'Agence Nationale de Recherches contre le SIDA et les hépatites (ANRS) décrit les principales causes de décès parmi les personnes séropositives. [42] Pour cette étude, 90 centres ont participé, représentant environ 82000 patients.

Les principales causes initiales de décès décrites par cette étude sont les suivantes :

- **Les maladies classant sida** : lymphome malin non hodgkinien, pneumocystose pulmonaire, leuco-encéphalopathie multifocale progressive
- **Les cancers non classant sida et non liés aux hépatites** : cancers broncho-pulmonaires, cancers digestifs, cancers oto-rhino-laryngologiques, cancers urogénitaux
- **Les atteintes hépatiques** : virus de l'hépatite B ou C, cirrhose d'origine non virale, hyperplasie nodulaire régénérative
- **Les atteintes cardiovasculaires** : cardiopathies ischémiques, accidents vasculaires cérébraux, insuffisances cardiaques
- **Les infections non classant sida**
- **Les suicides.** [42]

III. Physiopathologie de l'infection par le VIH

L'infection à VIH, est une maladie chronique au cours de laquelle une réplication persistante du virus se produit dans l'organisme et conduit à la destruction progressive du système immunitaire. [22] Cela se traduit par une déplétion lente et progressive des lymphocytes T CD4⁺ (LT-CD4⁺) qui sont la principale cible du virus. Les défenses immunitaires sont alors considérablement endommagées et exposent l'organisme à de multiples infections opportunistes pouvant conduire au décès de l'individu. [9]

En l'absence de traitement antirétroviral, trois phases peuvent être observées dans l'évolution de l'infection par le virus.

III.1. La primo-infection

La primo-infection par le VIH correspond à la phase aiguë d'invasion de l'organisme par le virus qui survient dans les douze premières semaines suivant la contamination. Au cours de cette période, les réponses immunes antivirales apparaissent et le réservoir viral se constitue.

- *Manifestations cliniques*

Dans 50 % des cas, la phase de primo-infection par le VIH est asymptomatique. En revanche, environ 50 % des patients développent des symptômes peu spécifiques tels qu'un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, asthénie, myalgie ou un syndrome mononucléosique.

Ces symptômes surviennent dans les deux à six semaines après la contamination par le virus. On parle alors d'une primo-infection symptomatique.

D'autres manifestations cliniques sont fréquemment observées, parmi elles :

- Des signes cutanéomuqueux : angine érythémateuse, pharyngite, ulcérations buccales ou génitales
- Des signes ganglionnaires : adénopathies axillaires ou inguinales
- Des signes digestifs : diarrhées, dysphagies, amaigrissement
- Des signes neurologiques : méningo-encéphalites. [9] [43]

En moyenne, ces manifestations cliniques durent moins de 14 jours. A l'inverse, une symptomatologie sévère et persistante au cours de la primo-infection sera un facteur de mauvais pronostic associé à une progression rapide de la maladie. [44]

- *Manifestations biologiques*

Au cours du syndrome de primo-infection à VIH, les principales anomalies biologiques sont hématologiques (thrombopénie, leucopénie et neutropénie) et hépatiques (hépatite aiguë cytolytique qui disparaît en général en quelques semaines). [43]

De plus, une lymphopénie initiale est associée au début du syndrome de primo-infection. Bien qu'elle porte sur toutes les sous-populations lymphocytaires, elle cible particulièrement les LT-CD4⁺. [43] En effet, au début de cette phase, la réplication virale est constante et conduit à une augmentation de la charge virale plasmatique, alors de l'ordre de 10⁸ copies d'ARN/mL. [9] Cette charge virale croissante, est responsable de la diminution rapide et significative du nombre de LT-CD4⁺ (entre 200 et 500/mm³) qui deviennent non fonctionnels. [45] La réponse immunitaire de l'organisme est alors limitée.

III.2. La phase de latence clinique

La latence clinique, correspond à une phase chronique de l'infection pendant laquelle, des mécanismes de défense immunitaire sont mis en jeu et permettent de contrôler partiellement la charge virale. [22]

- *Manifestations cliniques*

Cette phase, le plus souvent asymptomatique peut être prolongée, de plusieurs mois, à plusieurs années. Les quelques manifestations cliniques parfois retrouvées sont indicatives d'un déficit immunitaire modéré :

- Candidose oropharyngée
- Zona récurrent
- Syndrome constitutionnel : fièvre $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ou diarrhée depuis plus d'un mois. [46]

- *Manifestations biologiques*

La latence clinique, est caractérisée par l'apparition d'une réponse immunitaire cellulaire antivirale spécifique. En effet, une diminution progressive mais incomplète du nombre de virus dans le sang est observée, grâce à l'activation de lymphocytes T CD8^{+} (LT-CD8^{+}) cytotoxiques qui détruisent les LT-CD4^{+} infectés. Ces derniers vont donc diminuer lentement au cours de cette phase (entre 350 et $500/\text{mm}^3$) jusqu'à un équilibre apparent constituant la phase chronique de l'infection. [47] [48]

La synthèse d'anticorps neutralisants spécifiques anti-VIH1, permet également de diminuer la charge virale plasmatique (CV) jusqu'à un niveau spécifique correspondant à la chronicisation de l'infection. Cependant, un phénomène d'échappement à la réponse immunitaire se produit et épuise le système immunitaire. Une réplication virale persistante dans les ganglions lymphatiques et un renouvellement rapide des virions plasmatiques et des LT-CD4^{+} s'observe. [7]

III.3. Le stade SIDA

Le stade SIDA, correspond à la phase finale symptomatique de l'évolution du virus dans l'organisme. En effet, après plusieurs années, en l'absence de traitement antirétroviral adapté ou en cas de multiplication de virus mutants résistants au traitement, une recrudescence de la réplication virale se produit.

- *Manifestations cliniques*

Cette phase symptomatique, est le plus souvent associée à un déficit immunitaire profond. Le patient est alors exposé à de nombreux agents pathogènes responsables d'infections opportunistes telles que la tuberculose, la pneumocystose, la toxoplasmose cérébrale, les infections au cytomégalovirus... [46]

Des manifestations cancéreuses peuvent également apparaître au cours de cette phase. Pour exemple, le sarcome de Kaposi ou le lymphome non hodgkinien.

- *Manifestations biologiques*

A ce stade, le taux de LT-CD4⁺ chute brutalement atteignant 200/mm³. Le déclin se poursuit jusqu'à leur disparition complète et le décès du patient. [46]

Sur la figure 6, sont résumées les différentes étapes de l'évolution naturelle de l'infection par le virus.

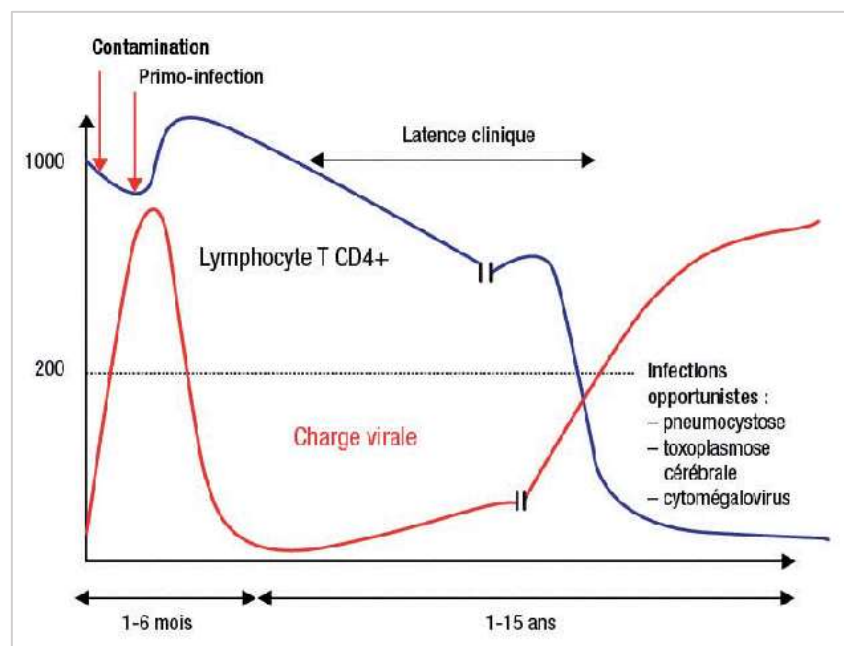


Figure 6 : Evolution naturelle de l'infection VIH [46]

A partir de 1993, les Centers for Diseases Control (CDS), ont établi une classification de l'infection VIH. Elle se décline en trois stades de sévérité croissante. Il est impossible pour un même patient, d'appartenir à deux stades ou de revenir, au cours de l'évolution de l'infection, à un stade classant antérieur. Cette classification combine à la fois des critères cliniques et le nombre de LT-CD4⁺. [9]

IV. Dépistage et diagnostic biologique du VIH

Les premiers tests de sérodiagnostic de l'infection par le VIH sont apparus en France en 1985. Ils ont permis la mise en place de stratégies de dépistage. En France, c'est dans un contexte marqué par « l'affaire du sang contaminé » que le dépistage anonyme et gratuit de l'infection a été rendu obligatoire pour les dons de sang et les dons d'organes et de tissus. [49]

IV.1. Stratégies de dépistage

D'après le rapport Morlat, « compte tenu des enjeux que représentent le dépistage tardif et le nombre de personnes séropositives qui ignorent leur infection, la Haute Autorité de Santé (HAS) a émis en octobre 2009, de nouvelles recommandations sur la stratégie de dépistage, modifiant radicalement l'approche élaborée en 1985 dans un contexte très différent. » [50]

En France, 150000 personnes vivent avec le VIH/SIDA et parmi elles, 24800 ignorent être infectées. En 2014, 5,3 millions de sérologies VIH ont été réalisées en laboratoire d'analyse médicale, mais 43% des découvertes de séropositivité étaient tardives. [2]

IV.1.1. Qui dépister ?

- *Dépistage en population générale*

La proposition de dépistage s'adresse à l'ensemble des personnes de 15 à 70 ans lors d'un recours au système de soins, en dehors de prise de risque identifiée. [50]

- *Dépistage ciblé et régulier*

Il existe une stratégie de dépistage en fonction des populations et des circonstances.

➤ **Selon les populations :**

Certaines populations, citées ci-dessous, doivent se voir proposer, à une fréquence régulière, un test de dépistage du VIH :

- « Les HSH multipartenaires, une fois par an
- Les personnes hétérosexuelles ayant eu plus d'un partenaire au cours des douze derniers mois
- Les UDI, une fois par an

- Les populations des départements français d'Amérique ou originaire d'Afrique subsaharienne et des Caraïbes, une fois par an
- Les personnes en situation de prostitution
- Les personnes dont les partenaires sexuels sont infectés par le VIH. » [50]

➤ **Selon les circonstances :**

Un test de dépistage doit être systématiquement proposé dans certaines situations particulières citées ci-dessous, quelle que soit la population :

- « Suspicion ou diagnostic d'Infection Sexuellement Transmissible (IST) ou d'hépatite B ou C
- Suspicion ou diagnostic de tuberculose
- Projet de grossesse
- Interruption volontaire de grossesse
- Première prescription d'une contraception
- Viol
- En cours d'incarcération. » [50]

- *Dépistage prénatal universel*

Les recommandations françaises les plus récentes, préconisent de proposer un contrôle sérologique à la consultation du 6^{ème} mois de grossesse, aux femmes séronégatives exposées à un risque viral, en particulier si le partenaire est séropositif ou de statut inconnu. Mais également, de proposer un test de dépistage VIH à tous les futurs pères. [50]

IV.1.2. Où se faire dépister et par qui ?

Les médecins généralistes doivent être les relais principaux de cette stratégie de proposition du test de dépistage à l'ensemble de la population. D'autres structures ou professionnels de santé acteurs du système de soins de premiers recours peuvent également participer tels que :

- Les gynécologues
- Les services de médecine universitaire
- Les centres de planification et d'éducation familiale.

En relais de cette stratégie, des structures et dispositifs complémentaires peuvent accueillir les populations ciblées pour réaliser les tests de dépistage :

- Les Centres Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des infections par le virus de l'immunodéficience humaine, les hépatites virales et les infections sexuellement transmissibles (CeGIDD)
- Les centres de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie
- Certaines structures associatives. [2] [49] [50]

IV.2. Diagnostic sérologique de première intention

IV.2.1. Principe du dépistage sérologique

« Le diagnostic biologique de l'infection par le VIH repose sur une stratégie en deux temps : analyse de dépistage puis analyse de confirmation. En effet, une analyse de dépistage positive sera toujours complétée par une analyse de confirmation sur le même prélèvement. L'infection par le VIH n'est établie que lorsque le résultat de l'analyse de confirmation est positif et que des résultats concordants sont obtenus sur deux prélèvements distincts. » [51]

- *Test de dépistage sérologique*

Le test de dépistage repose sur une méthode immunoenzymatique de type Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) combiné de 4^{ème} génération. Cette technique détecte à la fois les anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 mais aussi, l'antigène p24 du VIH-1 sur le sérum ou le plasma du patient. En effet, les anticorps anti-VIH apparaissent après une période d'environ 22 jours après le contage, appelée « fenêtre sérologique ». Ce test consiste en la formation de complexes antigène-anticorps révélés par un ligand conjugué à une enzyme à substrat chromogène.

Un résultat négatif de l'analyse de dépistage, signe l'absence d'infection par le VIH, sauf dans le cas d'une exposition supposée au VIH datant de moins de six semaines. [46] [49] [52]

- *Test de confirmation*

Lorsque le test de dépistage est positif, une analyse de confirmation par Western blot ou Immunoblot doit être réalisée sur le même échantillon sanguin. Elle permet de différencier une infection à VIH-1 ou à VIH-2. [49] Le Western blot est préparé à partir de protéines de virions purifiés. Il vérifie les spécificités des anticorps dirigés contre les protéines virales, présents dans

le sérum dépisté positif. [12] Dans cette technique, les protéines virales sont séparées par électrophorèse avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. La présence d'anticorps dirigés contre une protéine donnée est révélée par une réaction immunoenzymatique qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. [53]

Le résultat de confirmation est négatif quand aucune bande ne correspond à une protéine virale. Par contre, si le résultat de ce test est douteux, il est nécessaire de procéder à la détection de l'ARN viral plasmatique ou de l'antigène p24 (avec un seuil de détection au moins équivalent à celui du test ELISA combiné). Cela, dans le but d'éviter toute méconnaissance d'une primo-infection au stade de pré-séroconversion. [49]

Selon les critères de positivité définis par l'OMS, un Western blot est positif s'il détecte au minimum l'association d'anticorps dirigés contre deux protéines d'enveloppe (gp41, gp120, gp160) et contre une protéine spécifique des gènes gag ou pol. [12]

Si l'analyse de dépistage et de confirmation sont positives sur le même prélèvement, un second prélèvement devra obligatoirement être réalisé pour éliminer toute erreur d'identité. Sur ce prélèvement, il est recommandé de pratiquer à nouveau l'analyse de dépistage. En revanche, l'analyse de confirmation n'est pas nécessaire si le test de dépistage est à nouveau positif. Seul un résultat positif sur ce second prélèvement, permettra de valider le résultat et d'affirmer le diagnostic d'une infection par le VIH. [46] [49] [53]

La figure 7, résume les modalités de dépistage sérologique pour les adultes et enfants de plus de 18 mois.

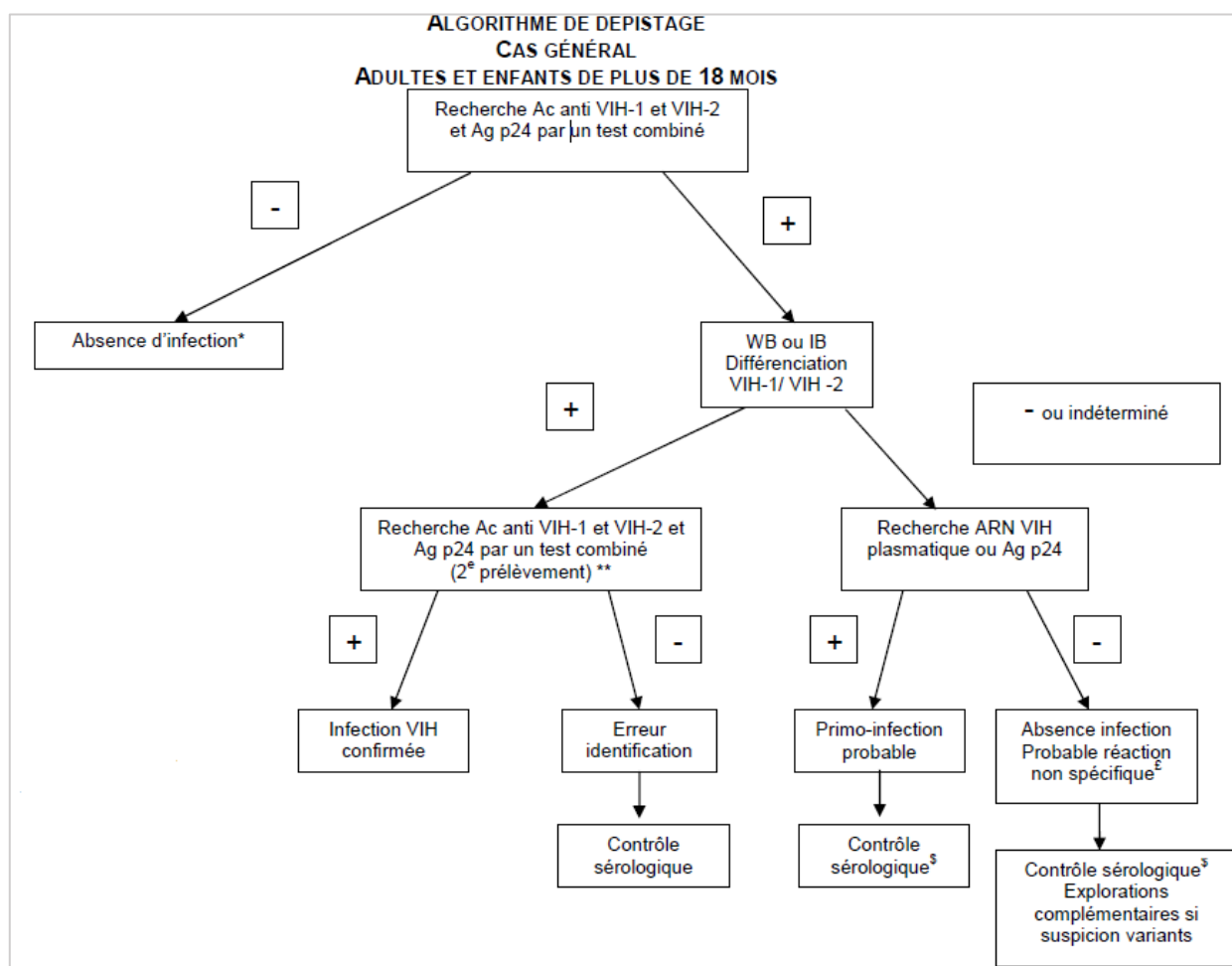


Figure 7 : Algorithme de dépistage du VIH chez les adultes et enfants de plus de 18 mois [49]

IV.2.2. Détection et quantification de l'antigène p24

Les antigènes viraux circulants correspondent aux particules virales et aux protéines virales libres. L'antigène p24, est le premier antigène viral détectable en général dans les quinze jours qui suivent la contamination. Sa détection et sa quantification se font par technique ELISA. Cette recherche est réservée au diagnostic précoce d'une primo-infection et au dépistage dans le cadre de dons du sang ou d'organe. En effet, l'antigène se négative en une à deux semaines avec l'apparition des anticorps. [12]

IV.3. Diagnostic moléculaire et suivi de l'infection

Bien que le diagnostic de certitude d'infection par le VIH soit obtenu grâce à la sérologie, la recherche directe du virus ou de ses constituants reste une méthode importante pour le dépistage, le diagnostic précoce et le suivi des patients infectés. [12]

IV.3.1. Quantification de l'ARN viral : charge virale

La technique d'amplification génique la plus employée pour la quantification de l'ARN viral est celle dite « de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) en temps réel » qui est plus sensible. Elle est utilisée de manière quantitative pour estimer le niveau de réplication du VIH dans l'organisme infecté. Cette quantification porte alors sur le virus libre plasmatique en mesurant l'ARN viral ou charge virale plasmatique. La charge virale s'exprime en copies/mL ou sous forme logarithmique décimale. Ce test de quantification est utilisé pour le suivi des personnes infectées, le diagnostic des bébés nés de mères séropositives ou après un AES. Mais, également en cas de suspicion de primo-infection puisque l'ARN est détectable environ dix jours après la contamination. [12] [53]

Sur la figure 8, est présentée l'évolution des marqueurs biologiques et leur délai d'apparition en fonction des différentes techniques de dépistage du VIH.

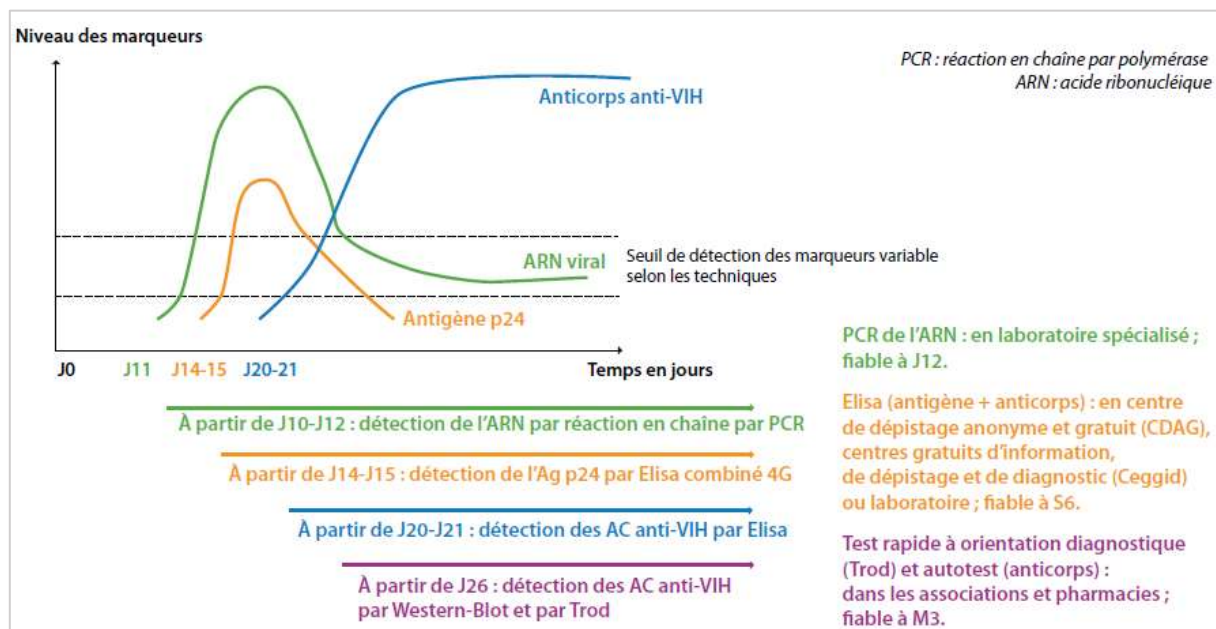


Figure 8 : Chronologie de positivité des tests de dépistage en fonction de l'évolution des marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par le VIH-1 [54]

IV.3.2. Isolement du virus par culture

L'isolement du virus s'effectue à partir des cellules mononuclées du sang périphérique du patient infecté, co-cultivées avec des cellules mononuclées de sujets sains. La culture *in-vitro*, permet la production de virus infectieux. C'est dans le surnageant de culture, que la production virale est recherchée. Le plus souvent, celle-ci est détectée par la présence de l'antigène p24 ou par la mesure de l'activité transcriptase inverse.

Cette technique est utilisée uniquement en recherche ou dans certains protocoles thérapeutiques. [12]

V. La prise en charge thérapeutique

V.1. Les traitements antirétroviraux

L'objectif des médicaments utilisés contre le VIH est de bloquer les différentes étapes de son cycle de réplication dans les cellules infectées mais aussi, de réduire sa capacité à infecter de nouveaux lymphocytes ou cellules CD4⁺.

Actuellement, il existe six classes d'antirétroviraux (ARV). Ces différentes classes sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Médicaments antirétroviraux commercialisés d'après le rapport Morlat, septembre 2016 (r = ritonavir) [55]

Classe pharmacologique	Molécules disponibles	Posologie
INTI (<i>empêchent l'élongation de l'ADN proviral par incorporation sur la chaîne</i>)	Abacavir (ABC)	300 mg x2/j ou 600 mg/j
	Emtricitabine (FTC)	200 mg x1/j
	Didanosine (ddI)	≥ 60 kg : 400 mg x1/j ≤ 60 kg : 250 mg x1/j
	Lamivudine (3TC)	150 mg x2/j ou 300mg x1/j
	Zidovudine (ZDV)	300 mg x2/j
	Ténofovir (TDF)	245 mg x1/j

Classe pharmacologique	Molécules disponibles	Posologie
INNTI (<i>inhibent directement la transcriptase inverse et empêchent l'élongation de l'ADN proviral</i>)	Efavirenz (EFV)	600 mg x1/j
	Etravirine (ETR)	200mg x2/j ou 400mg x x1/j
	Névirapine (NVP)	200 mg x1/j pendant 14 jours puis 200mg x2/j ou 400 mg x1/j en forme LP
	Rilpivirine (RPV)	25 mg x1/j
IP (<i>altèrent la maturation protéique des nouveaux virions</i>)	Atazanavir/r (ATV)	300/100mg x1/j ou 400mg x1/j (sans ritonavir)
	Darunavir/r (DRV)	800/100 mg x1/j pour un patient naïf 600/100mg x2/j pour un patient prétraité
	Fosamprenavir/r (FPV)	700/100mg x2/j
	Lopinavir/r (LPV)	400/100mg x2/j
	Saquinavir/r (SQV)	1000/100mg x2/j
	Tipranavir/r (TPV)	500/200mg x2/j
Inhibiteur de fusion (<i>bloque l'entrée du VIH dans les cellules CD4⁺ en ciblant la gp41</i>)	Enfuvirtide	90mg x2/j en sous cutanée
Inhibiteur de CCR5 (<i>empêche la pénétration du VIH dans la cellule par fixation au corécepteur cellulaire CCR5</i>)	Maraviroc	150à 600mg x2/j
INI (<i>bloquent l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée</i>)	Raltégravir (RAL)	400 mg x2/j
	Dolutégravir (DTG)	50mg x1/j pour un patient naïf 50mg x2/j pour un patient présentant des mutations de résistances aux autres INI

V.1.1. Les présentations combinées recommandées

Dans le cadre de l'optimisation du traitement antirétroviral, pour faciliter l'administration et renforcer l'observance des patients, plusieurs associations d'ARV sont disponibles sous forme de présentations combinées en un seul comprimé par jour :

- Abacavir + lamivudine : **Kivexa®**
- Ténofovir + emtricitabine : **Truvada®**
- Ténofovir + emtricitabine + efavirenz : **Atripla®**
- Ténofovir + emtricitabine + rilpivirine : **Eviplera®**
- Abacavir + lamivudine + dolutégravir : **Triumeq®**
- Elvitégravir + emtricitabine + ténofovir disoproxil : **Stribild®** [55]
- Elvitégravir + emtricitabine + ténofovir alafenamide : **Genvoya®** [56]

V1.2. Les principaux effets indésirables des antirétroviraux

Bien qu'ils visent à limiter l'évolution de l'infection vers le stade sida, les traitements ARV sont responsables d'un certain nombre d'effets secondaires. Ils sont généralement handicapants pour les personnes traitées et donc à l'origine d'une non-observance importante qui réduit la capacité à contrôler l'évolution de l'infection.

Les effets indésirables principalement retrouvés au cours de l'administration de ces traitements sont :

- **Les troubles digestifs** : nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, pancréatites
 - **Les troubles hépatiques** : élévation des transaminases, hépatite, stéatose
 - **Les atteintes dermatologiques** : éruptions cutanées, réactions d'hypersensibilité
 - **Les troubles neuropsychiques** : neuropathies périphériques, insomnies, dépression, fatigue, céphalées, sensations vertigineuses
 - **Les troubles rénaux** : insuffisance rénale, lithiase rénale
 - **Les troubles du métabolisme** lipidique et glucidique : diabète sucré, hyperlipidémie, lipodystrophie
 - **Les atteintes cardiovasculaires** : allongement de l'espace QT, infarctus du myocarde.
- [57]

V.1.3. Les interactions médicamenteuses des ARV

Les interactions pharmacologiques des ARV avec d'autres substances actives, peuvent réduire leur efficacité et/ou potentialiser leurs effets toxiques. Par conséquent, avant toute instauration de traitement, les prescripteurs doivent considérer l'ensemble des médicaments et thérapeutiques alternatives comme la phytothérapie ou les compléments alimentaires déjà administrés chez le patient.

De par leur métabolisme, leur potentiel inducteur ou inhibiteur enzymatique, et en considérant ce même potentiel dans les autres classes médicamenteuses, les interactions sont si nombreuses qu'il serait difficile d'en établir une liste exhaustive. Cependant, des outils existent pour aider et accompagner les professionnels de santé, par exemple, le site <http://www.hiv-druginteractions.org>. [58]

V.1.4. Le coût des traitements ARV

Le coût de la prise en charge des PVVIH dans les pays européens est élevé. En France, il est estimé à plus de 500 000 euros au total sur la durée de vie d'un patient soit environ 20000 euros par an. A eux seul, les traitements ARV représentent 73% de ce coût de prise en charge. Par conséquent, dans le contexte économique actuel, des recommandations sur les molécules à utiliser voient le jour dans un certain nombre de pays européens et vont probablement se généraliser.

Bien qu'il soit indispensable de prescrire aux patients les ARV les plus efficaces, les mieux tolérés et les plus faciles à prendre ; il faut envisager le coût comme un critère de sélection, lorsque l'utilisation d'une ou plusieurs combinaisons thérapeutiques moins coûteuse est possible. [59]

- *Utilisation de médicaments génériques*

Actuellement en France, les antirétroviraux génériques ayant une autorisation de mise sur le marché sont : la lamivudine, la zidovudine, la forme combinée lamivudine/zidovudine, la névirapine, l'efavirenz et le lopinavir/ritonavir. Ces médicaments génériques sont prescrits à la place des médicaments princeps à condition que les patients soient informés des raisons et implications de ce changement. Si un médicament générique prescrit s'avère non efficace, le retour à la forme princeps est autorisé. [59] [60]

Selon une étude américaine, le remplacement de l'association thérapeutique fixe Atripla® (1 comprimé/jour) par efavirenz générique + ténofovirDF + lamivudine générique en une prise de trois comprimés par jour permettrait d'économiser 900 millions de dollars par an aux Etats-Unis. [61] En termes d'efficacité, cette possibilité a été évaluée dans une étude qui montre la non-infériorité de l'association des trois comprimés sur la fréquence d'échec virologique, par rapport à l'association fixe en un comprimé par jour. [62]

- *Autres stratégies de réduction des coûts*

La prescription de médicaments génériques n'est pas la seule façon de diminuer le coût des traitements ARV. Plusieurs stratégies, dont la réduction significative du coût a été démontrée par des études médico-économiques peuvent être envisagées : [60]

- Remplacement des associations comportant des IP/r par des associations comportant des INNTI [63]
- Remplacement des associations comportant des IP/r par des bithérapies à base d'IP/r [64]
- Remplacement d'un ARV d'une classe par un ARV moins cher de la même classe. [65]

V.2. Stratégies thérapeutiques

Le principal objectif du traitement ARV est de maintenir ou restaurer un nombre de LT-CD4⁺ supérieur à 500/mm³ pour empêcher la progression de l'infection vers le stade sida et éviter le décès. Pour diminuer les effets pathogènes du virus et atteindre cet objectif, la prise en charge thérapeutique doit permettre :

- De diminuer la morbidité et la mortalité
- De maintenir une charge virale plasmatique indétectable (< 50 copies/mL)
- De prévenir et traiter les infections opportunistes
- La meilleure tolérance possible clinique et biologique
- De limiter les effets secondaires des traitements
- De prévenir la transmission sexuelle du virus. [66]

V.2.1. Initiation d'un premier traitement antirétroviral

Les recommandations sont d'instaurer un traitement ARV chez toute personne vivant avec le VIH quel que soit son taux de LTCD4⁺. Ce premier traitement doit rendre la charge virale indétectable (< 50 copies/mL) en six mois. [67]

- *Bilan initial*

Avant toute initiation de traitement par un médecin expérimenté dans la prise en charge des PVVIH, un bilan paraclinique complet, présenté dans le tableau 2, doit être réalisé.

Tableau 2 : Bilan paraclinique initial pré-thérapeutique d'un adulte infecté par le VIH d'après le rapport Morlat (novembre 2016) [66]

Sérologie VIH : deux tests ELISA sur deux prélèvements différents avec un test de confirmation par méthode de Western blot VIH1
Numération des populations lymphocytaires T CD4/CD8
Dosage de l'ARN VIH plasmatique (charge virale)
Test génotypique de résistance du VIH (transcriptase inverse, protéase, intégrase) et détermination du sous-type VIH
Recherche du groupage HLAB*5701
Hémogramme avec plaquettes
Transaminases, Gamma Glutamyl Transpeptidase (γ GT), phosphatases alcalines, bilirubine totale et conjuguée
Créatininémie et estimation du Débit de Filtration Glomérulaire (DFG)
Glycémie à jeun
Phosphorémie
Bilan lipidique à jeun : cholestérol total, triglycérides, LDL et HDL
Recherche d'une protéinurie
Marqueurs de l'hépatite virale B : Ag HBs, et anti HBc
Sérologie de l'hépatite virale C
Sérologie de l'hépatite virale A (IgG)
Sérologie de la syphilis (TPHA, VDRL)

Sérologie de la toxoplasmose

Sérologie CMV

Test IGRA pour le dépistage de la tuberculose latente

Si $CD4 < 200/mm^3$ ou personne provenant d'une zone d'endémie tuberculeuse :
radiographie thoracique

Si $CD4 < 100/mm^3$: dosage de l'antigène cryptocoque, de la PCR Cytomégalovirus (CMV) et réalisation d'un fond d'œil

Chez les femmes n'ayant pas eu de bilan dans l'année une consultation gynécologique avec réalisation d'un frottis cervicovaginal est recommandée

Chez les HSH et les PVVIH ayant des antécédents de lésions papillomavirus (HPV), une consultation proctologique sera proposée pour le dépistage des lésions précancéreuses de l'anus

- *Choix du premier traitement*

Le choix du premier traitement doit permettre d'atteindre un niveau optimal d'observance. Pour cela, le patient doit pouvoir participer à ce choix individualisé. Par conséquent, il fait intervenir la notion de tolérance, la facilité de prise en fonction du mode de vie du patient et les interactions médicamenteuses avec d'éventuels autres traitements déjà en cours chez le patient.

Le traitement de première ligne, est une trithérapie, basée sur la combinaison de deux INTI avec un troisième agent. Ce troisième agent peut être, un INNTI, un IP boosté par le ritonavir, ou un inhibiteur d'intégrase (INI). [66]

➤ INTI

Pour le choix des INTI, deux associations citées ci-dessous sont recommandées de préférence. Elles associent tolérance, efficacité et simplicité d'emploi (un comprimé par jour) :

- **abacavir + lamivudine** : utilisée uniquement chez des personnes non porteuses de l'allèle HLA B*5701
- **ténofovirDF + emtricitabine** : à préférer si la charge virale est supérieure 5 log copies/mL. [66]

➤ INNTI

Actuellement, l'efavirenz n'est plus retenu comme troisième agent d'une première trithérapie. En effet, une autre molécule, présentant un meilleur profil de tolérance et une efficacité équivalente ou supérieure est disponible en un comprimé par jour :

- **rilpivirine** : à condition que la charge virale soit inférieure à 5 log copies/mL

Le taux de résistance important aux INNTI impose de connaître le résultat du test génotypique de résistance avant d'entreprendre son instauration. [66]

➤ IP

L'IP utilisé comme troisième agent de la trithérapie doit être potentialisé (IP/r) par l'addition d'une faible dose de ritonavir (100mg/j). Cette classe n'entraîne que rarement des résistances précoces, c'est pourquoi, elle est recommandée pour initier un traitement antirétroviral chez les patients ayant une charge virale plasmatique élevée. La molécule utilisée est le **darunavir/r**, en une prise par jour.

L'atazanavir/r n'est plus retenu comme troisième agent. Il est moins bien toléré que le darunavir/r et n'apporte aucun bénéfice supplémentaire d'efficacité ou de simplicité de prise par rapport à ce dernier. [66]

➤ INI

Trois molécules représentant la classe des INI peuvent être utilisées comme troisième agent :

- **dolutégravir** : une seule prise par jour, ne nécessite pas de potentialisation pharmacologique et sa barrière génétique face à la résistance du VIH-1 est plus élevée que pour les deux autres molécules
- **raltégravir** : deux prises par jour
- **elvitégravir** : une seule prise par jour.

Pour la plupart des patients, ces molécules sont hautement efficaces, ont peu d'effets secondaires et n'ont pas d'interactions avec les molécules métabolisées par le cytochrome P450 3A4. [57] [68]

La réalisation d'un test génotypique incluant la recherche de mutations de résistances dans le gène de l'intégrase est recommandée avant d'envisager leur instauration.

Les options recommandées pour l'initiation d'un premier traitement antirétroviral sont résumées avec leurs dosages, posologies et précautions sur la figure 9.

2 INTI	INNTI	Nb cp/ Nb prises par jour	Commentaires
ténofovirDF/emtricitabine 245/200 mg x 1	rilpivirine 25 mg x 1	1/1	Uniquement si CV < 5 log copies/ml. Précaution si CD4 < 200/mm ³ Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min. Surveillance rénale. Prise au cours d'un repas. Association à un IPP contre-indiquée
2 INTI	INI		Commentaires
ténofovirDF/emtricitabine 245/200 mg x 1	dolutégravir 50 mg x 1	2/1	Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min. Surveillance rénale. Peu d'interactions médicamenteuses avec le dolutégravir
abacavir/lamivudine 600/300 mg x1	dolutégravir 50 mg x 1	1/1	Uniquement si HLA-B*5701 négatif Peu d'interactions médicamenteuses avec le dolutégravir
ténofovirDF/emtricitabine 245/200 mg x 1	elvitégravir/c 150/150 mg x 1	1/1	Association contre-indiquée si clairance de la créatinine < 70 ml/min. Précaution si clairance de la créatinine < 90 ml/min. Surveillance rénale. Interactions médicamenteuses avec cobicistat
ténofovirDF/emtricitabine 245/200 mg x 1	raltégravir 400 mg x 2	3/2	Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min. Surveillance rénale. Pas d'interaction médicamenteuse avec le raltégravir
2 INTI	IP/r		Commentaires
ténofovirDF/emtricitabine 245/200 mg x1	darunavir/r 800/100 mg x 1	3/1	Intérêt particulier dans les indications suivantes : immunodépression avancée, charge virale plasmatique élevée, nécessité d'entreprendre un traitement rapidement, femme enceinte. Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min. Surveillance rénale. Interactions médicamenteuses avec le ritonavir

Figure 9 : Options recommandées pour l'initiation d'un premier traitement antirétroviral d'après le rapport Morlat (novembre 2016) [66]

V.2.2. Prise en charge des situations d'échec virologique

Dans les situations d'échec virologique, on distingue, les situations de réplication virale faible, où la charge virale détectable est inférieure à 200 copies/mL ; et les échecs virologiques avérés, où la charge virale détectable est supérieure à 200 copies/mL. Chacune de ces situations doit être confirmée sur deux prélèvements consécutifs. [69]

- *En situation de réplication virale faible*

Les causes de l'échec virologique doivent être évaluées, identifiées et corrigées. L'échec virologique est le plus souvent lié à l'inobservance du patient. Dans ce cas, il peut lui être proposé d'adapter le schéma posologique à son rythme de vie (simplification du nombre de prises et du nombre de comprimés).

Si la réplication virale persiste malgré une amélioration de l'observance et que le patient reçoit un traitement par INNT ou INI, une modification du traitement au profit d'un IP/r doit être envisagée pour prévenir la sélection de mutations de résistance. [69]

- *En situation d'échec virologique avéré*

La persistance d'une réplication virale supérieure à 200 copies/mL expose à un risque élevé d'accumulation de mutations de résistance qui peut conduire à une progression clinique plus rapide du VIH. Par conséquent, dans cette situation, un changement de traitement doit être envisagé rapidement dans les semaines suivant la mise en évidence de l'échec virologique. En particulier, si le patient est traité par INNTI ou INI.

Le choix du nouveau traitement est décidé à l'occasion d'une concertation pluridisciplinaire associant cliniciens, virologues et pharmacologues.

Le nouveau traitement devra associer de préférence, un IP/r actif (darunavir/r) à deux autres ARV actifs parmi : l'etravirine, le raltégravir, le dolutégravir, le maraviroc et l'enfuvirtide. [69]

V.2.3. Optimisation de traitement en situation de succès virologique

Lorsque le succès virologique est obtenu ($CV < 50$ copies/mL), le traitement peut être optimisé et individualisé pour améliorer la tolérance, faciliter l'administration tout en maintenant l'efficacité.

Plusieurs stratégies peuvent alors être envisagées :

- Améliorer la qualité de vie du patient : simplifier l'administration en réduisant le nombre de prise et/ou d'unités de prise
- Corriger ou prévenir les effets indésirables
- Corriger ou prévenir les interactions médicamenteuses si de nouveaux traitements doivent être introduits
- Réduire le coût du traitement. [60]

V.3. Le suivi thérapeutique des patients

Le suivi thérapeutique des patients recevant un traitement ARV consiste en une surveillance clinique, biologique et immuno-virologique qui a pour but d'évaluer l'efficacité du schéma thérapeutique.

Après l'initiation d'un traitement, le patient doit être revu entre 2 et 4 semaines après l'instauration. [46]

V.3.1. Surveillance clinique

A chaque consultation, l'examen clinique permet de détecter d'éventuels signes d'intolérance aux antirétroviraux cités précédemment (effets indésirables des ARV). Mais, il est aussi l'occasion de s'assurer de l'absence de certains symptômes qui pourraient être évocateurs d'une infection opportuniste débutante. [22]

V.3.2. Surveillance biologique

Le bilan standard évalue la tolérance biologique des médicaments et peut mettre en évidence une toxicité liée aux antirétroviraux. Ce bilan trimestriel comporte au minimum : Numération Formule Sanguine (NFS)/plaquettes, créatininémie et transaminases. [22]

V.3.3. Surveillance immuno-virologique

Le suivi virologique repose sur la mesure de l'ARN-VIH plasmatique « charge virale » et le typage lymphocytaire.

Après l'obtention d'une charge virale indétectable, un suivi trimestriel la première année puis, au moins semestriel est proposé, intercalé d'un bilan annuel de synthèse hospitalière.

En revanche, les PVVIH dont le taux de lymphocytes CD4⁺ reste inférieur à 200/mm³ doivent poursuivre une surveillance hospitalière trimestrielle. [22] [70]

VI. La résistance aux antirétroviraux

Depuis quelques années, le nombre total d'antirétroviraux et de classes thérapeutiques a augmenté. Mais, les progrès accomplis voient naître l'émergence de VIH résistants aux antirétroviraux. Ces phénomènes de résistance, limitent les possibilités de choix thérapeutique parmi les molécules actives d'une même classe et représentent actuellement la cause majeure d'échec thérapeutique.

VI.1. Définition de la résistance et mécanismes

VI.1.1. Définition de la résistance

Les nombreuses erreurs introduites par la transcriptase inverse lors de la réplication virale, sont à l'origine de nombreux variants viraux qui circulent en même temps chez un patient. Si la réplication virale n'est pas totalement contrôlée et persiste chez un patient traité, le traitement antirétroviral non optimal, agit sur les virus sauvages (sans mutation). La population de virus mutants devient alors majoritaire et conduit à l'échec thérapeutique. [71]

La résistance aux antirétroviraux est donc liée à la sélection de quasi-espèces virales (sous population différentes d'un même virus), qui présentent des mutations dans les gènes codant pour les protéines cibles des antirétroviraux. Ces mutations, réduisent la sensibilité du virus au traitement par rapport à celle d'un virus sauvage. [72]

VI.1.2. Notion de barrière génétique

La barrière génétique d'un antirétroviral est définie par la capacité de ce dernier à sélectionner des virus résistants quand la réplication virale n'est pas contrôlée.

Cette notion comprend plusieurs caractéristiques :

- « Le nombre de changements nucléotidiques nécessaires pour obtenir une mutation de résistance
- L'impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'ARV
- L'impact de cette mutation sur la capacité répliquative virale. » (73)

En fonction de ces trois éléments, la vitesse de sélection des variants résistants sera différente. Pour un ARV, la barrière génétique peut être élevée, intermédiaire ou faible. Une molécule à barrière génétique élevée (surtout les IP) nécessite la sélection de plusieurs mutations pour atteindre un niveau de résistance élevé alors qu'une molécule à barrière génétique faible (surtout les INNTI) n'en nécessite qu'une seule. [71] [73]

VI.1.3. Mécanismes de la résistance

- *INTI*

Deux mécanismes de résistances peuvent être observés :

- Une diminution de l'incorporation des analogues nucléosidiques artificiels (INTI) au moment de la synthèse de l'ADN au profit de nucléosides naturels
- Une excision de l'analogue nucléosidique incorporé entraînant une reprise de l'élongation de la chaîne d'ADN viral en formation. [72]

- *INNTI*

Un seul changement d'acide aminé au niveau de la poche hydrophobe située à proximité du site actif de l'enzyme transcriptase inverse entraîne une diminution de l'affinité de la molécule pour ce site et donc une diminution de son efficacité. [72]

- *IP*

Le phénomène de résistance aux IP est graduel et conduit progressivement à l'accumulation de mutations. On distingue :

- Les **mutations majeures** qui apparaissent les premières et diminuent la liaison des IP à leur substrat enzymatique en agrandissant le site de fixation

- Les **mutations mineures**, qui surviennent secondairement, augmentent la résistance aux IP et permettent au virus de retrouver ses capacités répliquatives. [72]

- *INI*

Les mutations de résistance aux INI apparaissent autour du site catalytique de l'enzyme intégrase. Elles sont à l'origine de changements conformationnels qui diminuent l'affinité de la molécule pour ce site. L'inhibiteur n'est plus capable de chélater les cations nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme. [72] [74]

- *Inhibiteur de fusion*

Des mutations situées au niveau d'une des deux boucles trimériques de la glycoprotéine transmembranaire gp41 du virus réduisent la sensibilité à l'enfuvirtide qui inhibe la fusion et l'entrée du virus dans la cellule cible. [72]

- *Inhibiteur du corécepteur CCR5*

La résistance au maraviroc est liée à des modifications de la boucle V3 de la glycoprotéine de surface gp120 du virus. Celles-ci, empêchent l'enveloppe virale de s'attacher au complexe CCR5-maraviroc. [72]

Les mutations majeures impliquées dans la résistance aux antirétroviraux par classe pharmacologique sont disponibles en annexe 2. [75]

VI.2. Les tests de résistance

Test génotypique :

Même si plusieurs outils sont aujourd'hui disponibles pour évaluer la résistance aux ARV, la technique de génotypage de résistance s'impose comme la méthode de référence pour le monitoring des patients en routine au laboratoire. [74]

Les tests génotypiques ont pour objectif d'identifier les mutations présentes dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3 de la gp120 et de la gp41. [71] En routine, les laboratoires de biologie utilisent la technique de séquençage par la méthode de Sanger après amplification par RT-PCR, des gènes codant les protéines cibles des

antirétroviraux. Les étapes de la technique seront décrites de façon plus détaillée dans la partie « matériel et méthodes ».

Les principales étapes de réalisation des génotypes de résistance sont présentées sur la figure 10.

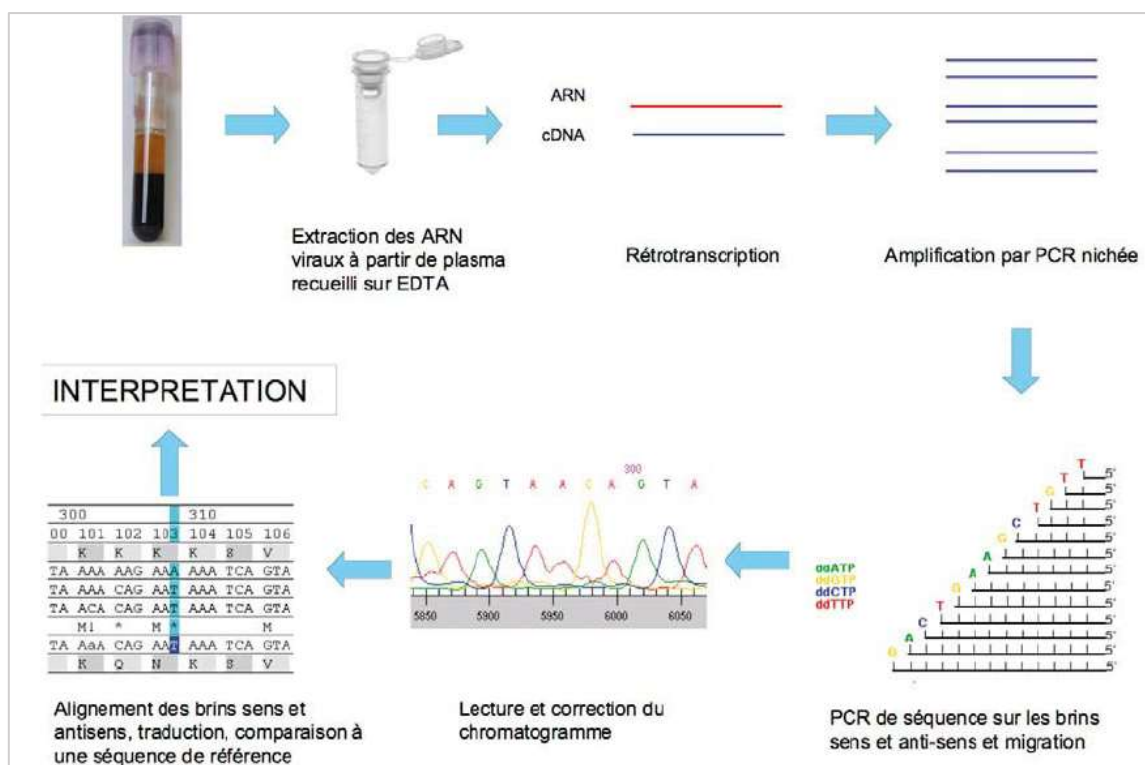


Figure 10 : Principales étapes de réalisation des génotypes de résistance [74]

Les mutations obtenues, sont interprétées par des algorithmes régulièrement actualisés, qui doivent être « cliniquement validés », et qui reposent sur des études de corrélation entre le profil de mutations et la réponse virologique vis-à-vis de l'antirétroviral analysé. Pour chaque antirétroviral, le résultat peut être exprimé différemment en mentionnant : « résistance » ou « résistance possible » ou « sans évidence de résistance ». [72]

La qualité des résultats est liée à l'expérience du laboratoire. C'est pourquoi, un contrôle de qualité externe annuel a été mis en place en 2001 par l'ANRS. Il est aujourd'hui sous la responsabilité du Centre National de Référence sur la résistance aux antirétroviraux (CNR) et concerne une soixantaine de laboratoire en France. [74]

Indications du test génotypique :

Des recommandations internationales permettent de définir la stratégie d'utilisation des tests génotypiques de résistance. Dans les pays industrialisés, ces tests représentent un outil pour aider les cliniciens dans leur décision thérapeutique, aux différentes étapes de la prise en charge de l'infection. On peut distinguer trois grandes situations pour lesquelles le test est recommandé :

- Avant l'initiation d'une thérapie : primo-infection ou infection récente
- Dans les situations d'échec thérapeutique
- Dans les situations particulières telles que : la grossesse, la prophylaxie post-exposition.

[76]

Dans ces situations, le test de génotypage est effectué à partir de l'ARN plasmatique. Dans certaines circonstances particulières, le test peut être réalisé à partir de l'ADN cellulaire. Chez les patients en succès virologique et pour lesquels un changement de traitement est envisagé, l'utilisation de l'ADN proviral constitue une alternative intéressante mais encore incertaine. [77] En effet, si un plasma détectable est disponible au laboratoire, il faut réaliser le génotypage ARN. Mais, si aucun plasma n'est disponible, la seule alternative est le génotypage sur ADN proviral qui est cependant moins sensible. Elle pourrait conduire à une sous-détection des mutations par rapport au cumul des résultats réalisés antérieurement à partir de l'ARN plasmatique.

VII. Présentation et objectifs du projet

Actuellement, au laboratoire de virologie du CHU d'Angers, le génotypage de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux, n'est réalisé que sur l'ARN plasmatique. La technique n'est utilisée que sur des échantillons de plasma dont la charge virale plasmatique est détectable et supérieure à 50 copies/mL. Cependant, cette technique est très longue et est parfois mise en échec par des charges virales « moyennes ». Elle ne permet pas d'analyser les échantillons pour lesquels la charge virale est indétectable ou trop faible pour être séquencée. En effet, le virus ne circule plus dans le plasma. A ce stade, il faut envisager de réaliser le génotypage sur l'ADN proviral à partir d'un échantillon de sang total. L'ADN proviral correspond au génome viral intégré dans l'ADN cellulaire et gardé en mémoire dans certains réservoirs comme les ganglions.

Pour l'instant, les échantillons de sang total dont la charge virale plasmatique est indétectable et pour lesquels un changement de traitement est envisagé, sont envoyés au laboratoire du CHU de Nantes.

L'objectif du laboratoire de virologie du CHU d'Angers est de mettre au point la technique de génotypage sur l'ADN proviral. Ensuite, de la tester sur l'ARN plasmatique pour qu'une technique unique adaptée aux deux matrices ARN et ADN soit utilisable et performante quelle que soit la charge virale du patient.

Pour commencer la mise au point de la technique, nous avons utilisé des réactifs différents de ceux qui servent en routine. Nous nous sommes inspirés du protocole de Nantes et l'avons adapté à notre matériel et aux conditions de travail.

PARTIE 2. MATERIEL ET METHODES

I. Echantillons biologiques

Pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé 18 échantillons de sang total qui avaient déjà été envoyés au CHU de Nantes et pour lesquels nous avons obtenu les résultats du séquençage sur l'ADN proviral. Il s'agit de patients infectés par le VIH et suivis au laboratoire de virologie du CHU d'Angers. Pour tous ces patients, la charge virale plasmatique était indétectable ($< 1.6 \log \text{ cop/mL}$). La méthode de séquençage sur l'ARN plasmatique utilisée en routine au CHU d'Angers n'a donc pas pu être réalisée sur ces échantillons.

Pour préserver l'anonymat des patients, les échantillons de sang total ont été identifiés de E1 à E18. L'ensemble des données est issu du logiciel GLIMS utilisé au laboratoire de virologie du CHU d'Angers. Les échantillons de sang total issus des prélèvements étaient conservés dans un congélateur à -80°C .

II. Méthodes

II.1. Extraction de l'ADN proviral

- *Principe et réalisation technique*

Pour obtenir l'ADN proviral à partir d'échantillons de sang total, nous avons réalisé une extraction automatisée sur le *NucliSENS easyMAG®*, un appareil commercialisé par BIOMERIEUX.

Pour la première étape de l'extraction, un tampon de lyse, « Lysis Buffer » est distribué par l'automate dans chaque cupule prête à recevoir les échantillons de sang total. Ce tampon permet de lyser les globules rouges du sang total qui vont libérer leur contenu et donc l'ADN proviral présent à l'intérieur du noyau des cellules sanguines.

Ensuite, un mix est préparé en fonction du nombre d'échantillons à extraire. Ce mix contient le tampon de lyse « Lysis Buffer » et de la silice magnétique. Cette méthode, repose sur l'adsorption sélective d'acides nucléiques sur des particules de silice magnétique. En effet, les débris cellulaires, les protéines et les molécules indésirables restent en solution alors que l'ADN se fixe sur la silice.

Une fois le mix préparé, 740µL sont déposés dans chaque cupule. On y ajoute une prise d'essai de 200µL de chaque échantillon de sang total à extraire. L'ensemble du mélange est homogénéisé à l'aide d'une pipette automatique multicanaux.

Après plusieurs étapes de lavages et purification, l'ADN proviral est libéré de la silice et élué avec un tampon sous un volume variable déterminé au préalable dans l'automate. [78] [79]

II.2. Réaction de PCR

- *Le kit de PCR*

Nous avons utilisé le kit *Premix Ex Taq™ (Hot Start Version)* commercialisé par TaKaRa Bio Inc. Ce kit est différent de celui utilisé actuellement en routine pour la technique sur l'ARN.

Ce kit contient :

- La *TaKaRa Ex Taq* HS : il s'agit d'une Taq DNA polymérase thermorésistante nécessaire à l'élongation des amorces.
- Le *dNTP mixture* : qui contient des désoxyribonucléotides, précurseurs de la réaction, qui vont être incorporés par la Taq polymérase pour allonger les amorces.
- Le *Ex Taq* Buffer : un tampon qui contient du Mg^{2+} nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme. [80] [81]

- *Les amorces*

Pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé des amorces différentes de la routine. En revanche, il s'agissait des mêmes amorces que celles utilisées par le CHU de Nantes. Ces amorces sont décrites par l'ANRS.

Un couple d'amorces avec un brin sens et un brin anti-sens est utilisé pour chacun des quatre gènes et pour chacune des deux PCR. Chaque couple porte le nom de « *outer* » pour la première PCR et « *inner* » pour la PCR nichée. Ces amorces sont présentées dans le tableau 3. [82]

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées par le CHU de Nantes

Gène	Couple d'amorce	Sens	Nom de l'amorce	Taille de l'amplicon (pb)
Protéase	Outer	Sens	5'PROT1	649
		AntiSens	3'PROT1	
	Inner	Sens	5'PROT2	515
		AntiSens	3'PROT2	
Réverse transcriptase	Outer	Sens	MJ3	941
		AntiSens	MJ4	
	Inner	Sens	A35	806
		AntiSens	NE135	
Intégrase	Outer	Sens	INPS1	770
		AntiSens	INPR8	
	Inner	Sens	INPS3	723
		AntiSens	INPR9	
gp120	Outer	Sens	Env31	586
		AntiSens	Env8	
	Inner	Sens	Env7	374
		AntiSens	ED33	

Nous avons aussi conservé les amorces de routine pour une éventuelle utilisation en seconde intention au cours de notre mise au point. Contrairement à celles de Nantes, elles ne sont pas décrites par l'ANRS, elles ont été définies par un des biologistes lors de la mise en place du génotype de résistance au laboratoire d'Angers dans les années 2000. Elles sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Liste des amorces de routine utilisées par le CHU d'Angers

Gène	Couple d'amorce	Sens	Nom de l'amorce	Taille de l'amplicon (pb)
Protéase	Outer	Sens	PRP1	1199
		AntiSens	PRP2	
	Inner	Sens	PR1	457
		AntiSens	PR2	
Réverse transcriptase	Outer	Sens	PRP1	1199
		AntiSens	PRP2	
	Inner	Sens	RT1	741
		AntiSens	RT2	
Intégrase	Outer	Sens	IN12	1263
		AntiSens	IN13	
	Inner	Sens	IN1	1085
		AntiSens	BH4	
gp120	Outer	Sens	E10	1359
		AntiSens	E11	
	Inner	Sens	E12A	438
		AntiSens	E13	

- *Principe de la PCR*

La PCR ou Polymerase chain reaction est le chef de file des méthodes d'amplification génique. L'amplification génique, permet de multiplier de manière exponentielle un fragment d'ADN cible.

Pour le génotypage de résistance du VIH-1, la PCR met en évidence des régions ciblées du génome viral, intégrées au génome cellulaire, par amplification à l'aide d'une enzyme ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase). Les régions sont celles qui codent pour les enzymes ou protéines impliquées dans le cycle de réplication du VIH :

- Protéase
- Reverse Transcriptase
- Intégrase
- Gp120.

La technique de PCR, est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour cela, des segments d'acides nucléiques connus, des oligonucléotides, vont servir d'amorces et s'associer à la matrice par complémentarité pour initier le processus.

La réaction de PCR peut se décomposer en plusieurs étapes présentées ci-dessous :

- **La dénaturation thermique** ($\approx 95^{\circ}\text{C}$) : les deux brins d'ADN sont séparés par la chaleur qui rompt les liaisons hydrogènes. Les deux brins séparés en ADN simple brin, vont servir de matrice au cours des cycles d'amplification.
- **L'hybridation** des amorces ($\approx 55^{\circ}\text{C}$) : les deux amorces (sens et antisens, chacune complémentaire d'un des brins), s'hybrident à tout ADN simple brin qui comporte la séquence complémentaire. Elles vont déterminer les bornes de la séquence à amplifier.
- **L'élongation (ou extension)** des amorces ($\approx 72^{\circ}\text{C}$) : l'enzyme ADN polymérase (Taq polymérase) incorpore des désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) complémentaires de la séquence de la matrice, pour allonger l'amorce à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue toujours dans le sens $5' \rightarrow 3'$.

Ces trois étapes sont répétées de manière cyclique au cours du processus d'amplification. A chaque cycle, le nombre de copies de la séquence cible est doublé. Ainsi, l'amplification de la séquence cible est exponentielle.

A la fin de la réaction, les produits de PCR sont refroidis à 4°C pour conserver les amplicons.

Pour le génotypage de résistance du VIH-1, deux PCR successives sont nécessaires. La première PCR est classique et s'effectue selon les étapes décrites précédemment. En revanche, la deuxième PCR est appelée « PCR nichée (nested PCR) ». Au cours de cette PCR, le produit issu de la première PCR est amplifié à nouveau grâce à un second couple d'amorces. La particularité de ces amorces, est qu'elles s'hybrident à une partie interne de la séquence précédemment amplifiée d'où le terme de « PCR nichée ». L'intérêt de cette méthode est d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction. [80]

- *Réalisation technique*

La première étape consiste à préparer un mix, différent pour chacune des deux PCR puisque les amorces utilisées ne sont pas les mêmes. Cette étape est réalisée dans une pièce « propre » sous une hotte.

Dans le tableau 5 ci-dessous est présentée la composition du mélange réactionnel pour la PCR.

Tableau 5 : Composition du mix de PCR

Composition	Volume pour 1 tube	Concentration finale
Eau PPI	12.5µL	
Premix ExTaq HS [2X]	25µL	[1X]
Amorce Sens [20µM]	1.25µL	[500nM]
Amorce AntiSens [20µM]	1.25µL	[500nM]

Les amorces, préalablement reconstituées à 100µM puis aliquotées sous 10µL et stockées à -20°C, sont diluées à 20µM en ajoutant 40µL d'eau pour préparation injectable (PPI).

La quantité de mix à réaliser est calculée pour le nombre d'extraits à amplifier plus un, pour être certain d'avoir une quantité suffisante à distribuer dans les barrettes. Un mix est réalisé pour chacun des quatre gènes à amplifier (protéase, reverse transcriptase, intégrase, gp120).

Les barrettes sont identifiées avec le nom du gène amplifié et le numéro de l'échantillon extrait sur chaque puits.

Pour la première PCR, 40µL de mix sont distribués dans chaque puits auxquels on ajoute 10µL d'ADN extrait. Un puits est rempli avec 10µL d'eau PPI pour constituer le témoin négatif qui sert de contrôle et nous assure de l'absence de contamination. Le dépôt des extraits se fait dans la zone de pré-amplification.

Pour la PCR nichée, 40µL de mix sont également distribués dans chaque puits auxquels on ajoute 10µL des produits issus de la première PCR. Le dépôt des 10µL se fait alors dans la zone de post-amplification.

Pour réaliser la réaction, les barrettes sont placées dans un thermocycleur VERITY (le thermocycleur pour la PCR nichée se trouve en zone post PCR). Le programme avec les profils de température est le même pour les deux PCR et est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6 : Programme et profils de température utilisé pour les PCR

Température	Temps	Nombre de cycles	Etape
95°C	5min	1	Dénaturation
95°C	30 sec	40	Dénaturation
55°C	30 sec		Hybridation
72°C	1 min		Elongation
72°C	10 min	1	Elongation
4°C	Infini	1	Refroidissement

II.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

- *Principe et réalisation technique*

Pour vérifier l'efficacité de l'amplification, une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% est réalisée à partir des produits de la deuxième PCR (PCR nichée). Il s'agit d'une technique de séparation des fragments d'acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. Elle va permettre d'identifier si les fragments d'ADN attendus ont été amplifiés et si leur taille est la bonne.

La première étape consiste à préparer les gels. Pour fabriquer deux gels, 120mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE) à 0,5X sont mélangés dans un erlenmeyer avec un sachet de 2g de poudre d'agarose préparé au préalable. Le mélange est chauffé au four à micro-ondes jusqu'à obtention d'une solution limpide. Après refroidissement de cette solution, 4 gouttes de Bromure d'Ethidium (BET) sont ajoutées sous une hotte. Le BET, est une molécule qui s'intercale entre les bases de l'ADN double brin et dont l'exposition à un rayonnement UltraViolet (UV) la fait fluorescer et permet de repérer les fragments d'ADN qui ont migré. Le gel est ensuite coulé dans une cuve composée d'un support et de peignes mis en place pour former les puits. La solution refroidit pendant environ 30 minutes et le gel prend.

Ensuite, vient l'étape de la migration. Le gel sur son support est immergé dans une cuve à électrophorèse contenant le tampon TBE à 0.5X. Dans une plaque à puits profonds, 5µL de produits de la PCR nichée sont déposés et mélangés avec 2µL de bleu de bromophénol. Ce produit contient du glycérol qui empêche le mélange entre l'échantillon et le tampon lors du dépôt dans les puits du gel. Il permet aussi de visualiser la migration. Les 7µL présents dans les puits de la plaque, sont déposés dans les puits du gel.

Un puits sur chaque ligne du gel, est rempli avec 4µL d'un étalon de poids moléculaire de 1kilobase donnant une bande tous les 100 paires de bases et qui permet de comparer la taille des fragments. La migration dure 30 minutes à 135 volts. Grâce au champ électrique, l'ADN chargé négativement, va migrer vers la cathode chargée positivement.

Enfin, le gel est placé sous ultraviolets pour révélation. A l'aide du logiciel « Vision Capt », une photo des résultats est prise et peut être enregistrée. [83]

II.4. Purification des produits de la PCR nichée

- *Principe et réalisation technique*

La première purification des produits de la PCR nichée a pour but d'isoler les amplicons d'ADN et d'éliminer les restes de réactifs (enzymes, amorces, nucléotides, sels...). Cette technique de purification se réalise en microplaque, constituée de puits plats au fond desquels se trouve une membrane qui sert de filtre.

Pour cette technique de purification par microfiltration, un kit de purification *NucleoFast*® 96 PCR est utilisé sur l'automate *MultiPROBE II*. Cinquante microlitres de produits de la PCR nichée sont chargés sur le filtre. Un vide est appliqué, le liquide est aspiré tandis que les amplicons d'ADN sont retenus à la surface du filtre. Pour que la technique fonctionne, il est nécessaire que les fragments d'ADN aient une taille supérieure à 150 paires de base. Sinon, ils risqueraient d'être aspirés également à travers le filtre. Ensuite, deux lavages à l'eau PPI sont réalisés avant de récupérer dans une autre microplaque, les fragments d'ADN élués sous 50 µL, qui se trouvent au-dessus du filtre. [84] [85]

II.5. Quantification de l'ADN

- *Principe et réalisation technique*

La concentration en ADN dans chaque échantillon est déterminée par une mesure au Nanodrop ND-1000, un spectrophotomètre UV/visible. Deux microlitres de produits purifiés sont déposés sur la marche de dépôt. L'automate fait passer un laser et mesure l'absorbance à 260 et 280nm. Une courbe est alors obtenue et pour chaque échantillon, la valeur de l'absorbance à 260 nm est multipliée par un facteur de conversion égal à 50 qui permet de déterminer la concentration en acides nucléiques en ng/µL.

Le rapport de l'absorbance à 260nm et 280nm doit être compris entre 1.8 et 2. Si non, cela signifie que le produit n'est pas pur.

A partir des concentrations obtenues, les échantillons sont dilués pour obtenir une concentration de 1ng/μL. [78]

II.6. Séquençage

II.6.1. PCR de séquence

- *Le kit de PCR*

La PCR de séquence est réalisée avec le kit *Big dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Ce kit est un mélange réactionnel contenant :

- L'enzyme *Taq* polymérase
- Les 4 désoxyribonucléotides
- Les 4 didésoxyribonucléotides marqués chacun par un fluorochrome différent

- *Les amorces*

Les couples d'amorces utilisés pour la PCR de séquence sont identiques à ceux utilisés précédemment dans la mise au point, pour la PCR nichée.

- *Principe de la PCR de séquence*

Le séquençage est une méthode qui consiste à déterminer la succession des nucléotides sur l'ADN. Ce procédé, permet de déterminer les différentes anomalies responsables de maladies génétiques, ou mutations à l'origine de la résistance aux traitements antirétroviraux.

Le laboratoire de virologie du CHU d'Angers utilise la méthode de Sanger automatisée. [86] La PCR de séquence est une technique de PCR classique réalisée sur les produits purifiés précédemment. Cependant, une seule amorce sens ou anti-sens est utilisée pour ne séquencer qu'un seul brin d'ADN.

Dans le mélange réactionnel, des Didésoxyribonucléotides Triphosphates (ddNTP) sont ajoutés. Par rapport aux Désoxyribonucléotides (dNTP), le groupement 3'OH du ribose est absent. Ils ont en plus, la particularité d'être marqués par un fluorochrome spécifique de chaque nucléotide.

Après hybridation de l'amorce avec sa séquence complémentaire à analyser, l'enzyme Taq polymérase assure l'élongation de l'amorce par l'incorporation de dNTP. Cependant, lorsque l'enzyme rencontre et incorpore un ddNTP à la place d'un dNTP, elle ne peut plus continuer sa polymérisation. En effet, l'absence du groupement 3'OH sur le ddNTP empêche sa liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. La réaction d'extension est alors interrompue. Théoriquement, un ddNTP est incorporé pour chaque position. Ainsi, de nombreux fragments d'ADN sont obtenus, de tailles variables avec une base marquée à leur extrémité. [87]

- *Réalisation technique*

La première étape consiste toujours à préparer le mélange réactionnel pour la PCR de séquence. La composition de ce mélange est indiquée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Composition du mix pour la PCR de séquence

Composition	Volume pour 1 tube	Concentration finale
Eau PPI	10.5µL	
Tampon Big Dye [5X]	3µL	[1X]
Amorce [20µM]	0.5µL	[0.5µM]
Big Dye Terminator v3.1	1µL	

Ensuite, sur une microplaque, 15µL du mélange réactionnel sont déposés, auxquels sont ajoutés 5µL d'ADN purifié.

La réaction de PCR de séquence est effectuée dans un thermocycleur VERITY dont le programme et profils de température sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Programme et profils de température utilisé pour le PCR de séquence

Température	Temps	Nombre de cycles	Etape
96°C	1min	1	Dénaturation
96°C	10 sec	25	Dénaturation
50°C	5 sec		Hybridation
60°C	4 min		Elongation
4°C	Infini	1	Refroidissement

II.6.2. Purification des produits de la PCR de séquence

- *Principe et réalisation technique*

Pour conserver uniquement les brins d'ADN « propres » et éliminer les ddNTP qui peuvent gêner la lecture au séquenceur, une purification des produits de la PCR de séquence est réalisée. Dans chaque puits, 80µL d'isopropanol à 70% sont ajoutés. Après au moins 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les microplaques sont centrifugées pendant 45 minutes pour culoter l'ADN qui précipite puisqu'il est insoluble dans l'isopropanol. Ensuite, par retournement des plaques, les impuretés liquides sont éliminées. Une deuxième centrifugation est réalisée avant de remettre l'ADN du culot en suspension dans 20µL de formamide qui permet de conserver l'intégrité de l'ADN.

II.6.3. Migration électrophorétique

- *Principe et réalisation technique*

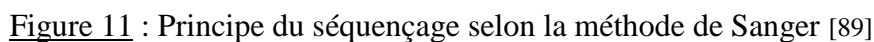
La dernière étape du séquençage, consiste en une électrophorèse capillaire dans le séquenceur automatisé *ABI 3130XL* pour séparer les fragments d'ADN qui vont migrer selon leur taille.

Un gel de polyacrylamide hautement résolutif (qui sépare l'ADN base par base), est injecté dans un capillaire. Ce capillaire est immergé dans la solution d'ADN précédemment purifiée. Le liquide monte dans le capillaire et se diffuse sous l'influence d'un champ électrique. Au bout du capillaire, un laser excite les fluorochromes présents sur chaque ddNTP. A chaque passage d'un fragment d'ADN, la fluorescence émise est mesurée. Le signal lumineux est traité par un ordinateur qui donne les résultats sous forme d'un fluorogramme par une succession de pics de couleurs différentes, chaque couleur correspondant à un nucléotide donné. Cela permet d'assigner une base et de déterminer la séquence nucléotidique. [87]

II.7. Analyse des chromatogrammes

Les séquences nucléotidiques obtenues sont récupérées et transférées dans le logiciel *Greg +*. Il s'agit d'un logiciel qui permet d'aligner les séquences déterminées avec des séquences de référence contenant les mutations. Les séquences nucléotidiques sont traduites en séquences protéiques d'acides aminés. Si des mutations impliquées dans la résistance aux traitements antirétroviraux sont présentes sur la séquence à analyser, elles peuvent être détectées par

La figure 11 présente le principe du séquençage selon la méthode de Sanger.



PARTIE 3. RESULTATS DE L'ETUDE

I. Détermination des conditions expérimentales pour détecter l'ADN proviral

I.1. Détermination du volume d'élution lors de l'extraction de l'ADN et du volume d'extrait d'ADN à déposer pour la réaction de PCR

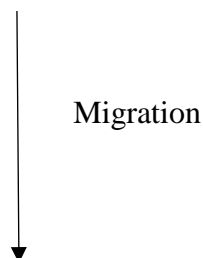
La première étape dans la mise au point de la technique, consistait à déterminer un volume d'éluat optimal à récupérer lors de l'extraction de l'ADN. Ensuite, il fallait déterminer le volume d'extrait d'ADN à déposer dans les barrettes contenant le mix préparé pour la première PCR.

Pour cela, nous avons utilisé deux extraits d'échantillons avec deux sous-types viraux différents selon les résultats du CHU de Nantes. L'extrait E1, de sous-type viral B et l'extrait E2, de sous-type viral CRF02. Ces deux échantillons ont été extraits séparément. Les premières PCR et PCR nichées ont également été réalisées séparément. En revanche, la migration sur gel d'agarose s'est faite en même temps.

Chaque échantillon a été extrait avec une prise d'essai de 200µL de sang total. Un éluat de 50µL et un autre de 100µL ont été récupérés. Après préparation et dépôt des 40µL du mix de première PCR pour chaque gène, chaque barrette contenait 4 puits. Les extraits ont été déposés de la façon suivante :

- 1 puits avec 5µL d'extrait élué sous 50µL et 5µL d'eau
- 1 puits avec 10µL d'extrait élué sous 100µL
- 1 puits avec 10µL d'extrait élué sous 50µL
- 1 puits témoin négatif.

Après migration et révélation sous UV, les résultats obtenus se trouvent sur la figure 12. Toutes les photos de gels présentées ont le même sens de migration défini ci-dessous :



Pour rappel, les tailles des bandes attendues par rapport à l'échelle de poids moléculaire pour chaque gène lors de la PCR nichée sont les suivantes :

- Protéase (PROT) : 515pb →
- Réverse Transcriptase (RT) : 806pb ←
- Intégrase (IT) : 723pb ←
- GP120 (GP) : 374pb ←

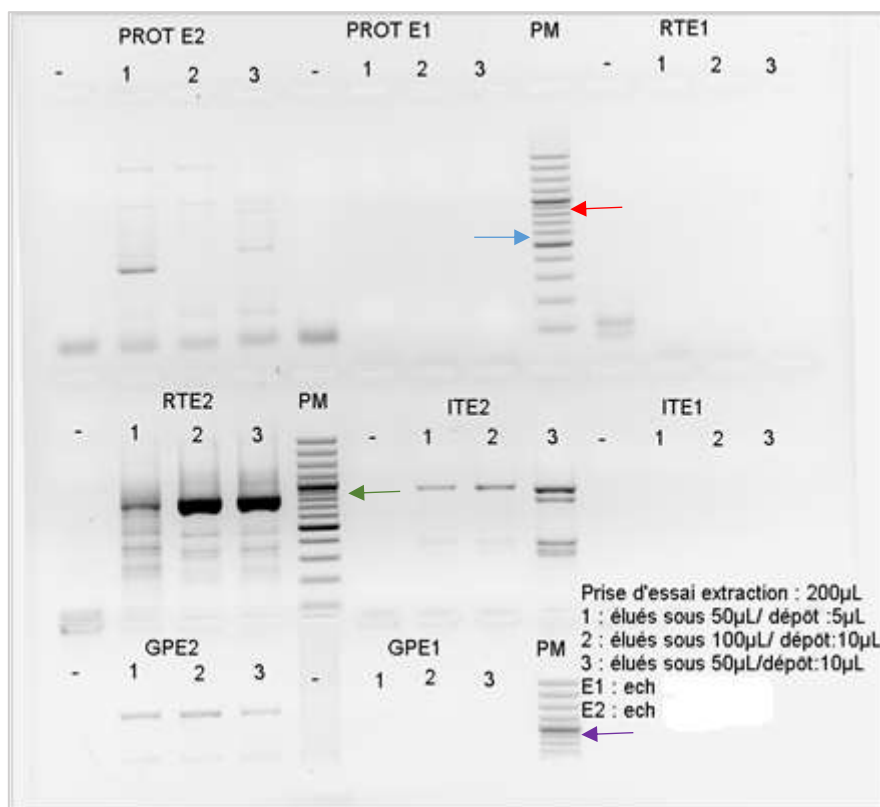


Figure 12 : Photo du gel avec variation du volume d'élution et du volume de dépôt

Pour cette première manipulation, la technique n'a pas très bien fonctionné puisque seuls les gènes de la réverse transcriptase et de l'intégrase ont été amplifiés et uniquement pour l'échantillon E2.

Les autres bandes que l'on retrouve sont non spécifiques c'est-à-dire qu'elles ne correspondent pas à la taille de l'amplicon normalement attendue.

Pour la réverse transcriptase de l'échantillon E2, la PCR avec un dépôt de 10µL a mieux fonctionné qu'avec le dépôt de 5µL. En revanche, il n'y a pas de différence entre l'élution sous 50µL et l'élution sous 100µL à volume de dépôt égal.

Pour l'intégrase de l'échantillon E2, on retrouve des bandes dites « parasites » pour l'élution sous 50µL qu'on ne retrouve pas pour l'élution sous 100µL.

Les PCR n'ayant pas bien fonctionné, nous les avons recommencés pour les deux échantillons, mais cette fois ci en même temps.

Les résultats obtenus se trouvent sur la figure 13.

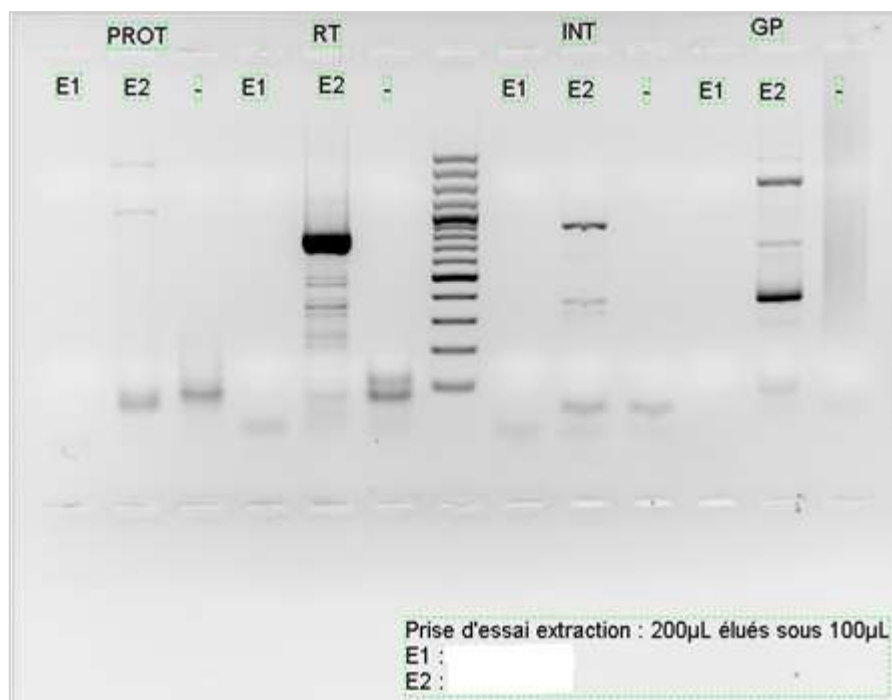


Figure 13 : Photo du gel après PCR effectuée en même temps pour les 2 échantillons

Les gènes de la reverse transcriptase, de l'intégrase et de la gp120 ont été amplifiés pour l'échantillon E2 mais pas le gène de la protéase.

En revanche, aucun des gènes n'a été amplifié pour l'échantillon E1.

Nous avons décidé de poursuivre la mise au point avec un volume d'élution de 100μL pour l'extraction de l'ADN proviral et un volume de dépôt de 10μL d'extrait.

I.2. Détermination de la température d'hybridation des amorces

La seconde étape de la mise au point, consistait à déterminer la température d'hybridation optimale des amorces avec les séquences d'ADN cible complémentaires. Pour cela, nous avons fait varier la température d'hybridation dans le thermocycleur pour la première PCR uniquement.

Nous avons utilisé deux extraits d'échantillons élués sous 100 μ L avec deux sous-types viraux différents selon les résultats du CHU de Nantes. L'extrait E3, de sous-type CRF02 et l'extrait E4, de sous-type B.

Au total, douze barrettes ont été utilisées pour cette manipulation. En effet, chacun des quatre gènes a été testé avec une température d'hybridation de 55°C, 57°C et 59°C au cours de la première PCR. Pour la PCR nichée, la température d'hybridation a été maintenue à 55°C.

En augmentant la température d'hybridation, l'objectif était d'augmenter la stringence c'est-à-dire, la capacité des amorces à s'hybrider uniquement avec une séquence d'ADN cible parfaitement complémentaire.

Les résultats obtenus se trouvent sur les figures 14 et 15.

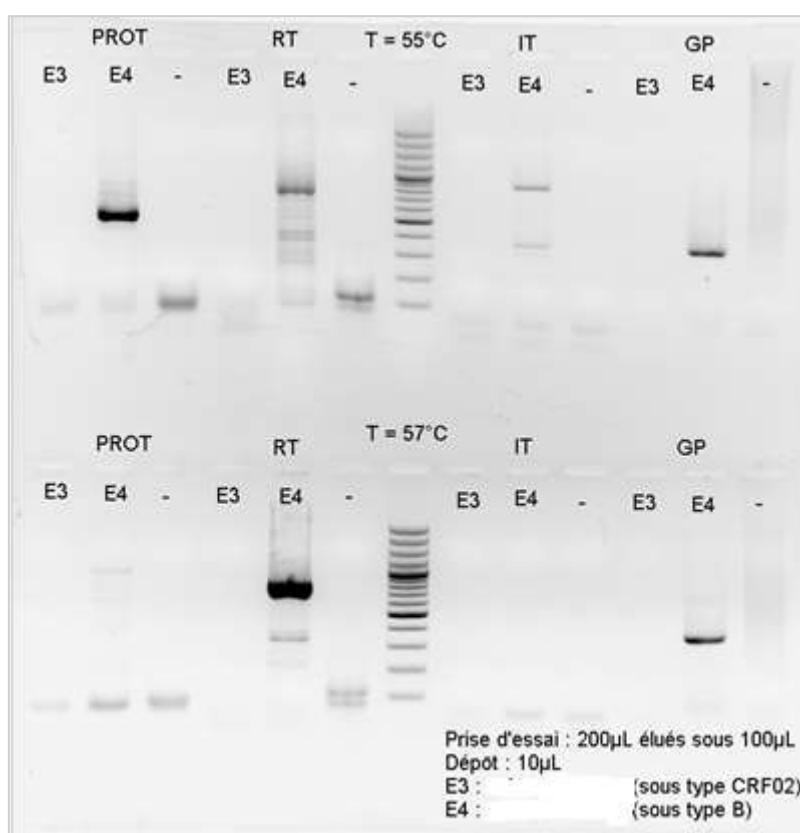


Figure 14 : Photo du gel avec une température d'hybridation (T) de 55°C et 57°C en 1ère PCR

A une température d'hybridation de 55°C, les quatre gènes ont été amplifiés pour l'échantillon E4.

Même si la bande pour le gène de la reverse transcriptase paraît plus intense à 57°C pour l'échantillon E4, les gènes de la protéase et de l'intégrase n'ont pas été amplifiés à cette température.

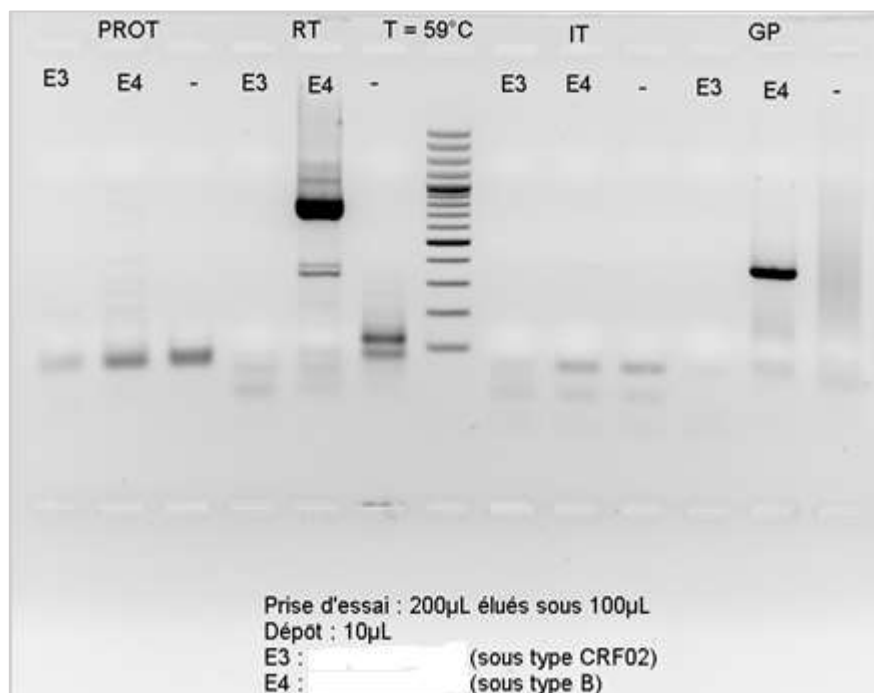


Figure 15 : Photo du gel avec une température d'hybridation de 59°C en 1ère PCR

De la même façon, les bandes pour les gènes de la reverse transcriptase et de la gp120 semblent plus intenses à la température de 59°C mais les gènes de la protéase et de l'intégrase n'ont pas été amplifiés.

Concernant l'échantillon E3, aucun des gènes n'a été amplifié quelle que soit la température.

Avec ces résultats, nous avons décidé de poursuivre la mise au point en utilisant une température d'hybridation de 55°C.

I.3. Détermination de la concentration en amorces

La dernière étape de la mise au point, consistait à déterminer la concentration finale optimale en amorces. Pour cela, nous avons fait varier la concentration finale en amorces dans les barrettes pour la PCR nichée uniquement. Les volumes nécessaires en eau PPI et amorces à mélanger dans le mix pour obtenir successivement des concentrations de 200nM, 350nM, 500nM et 650nM ont été calculés.

Cette fois, un seul échantillon, E4, a été utilisé. Puisqu'aucun paramètre ne variait pour la première PCR, les produits de première PCR avec la température d'hybridation de 55°C précédemment décrits ont été réutilisés. Pour être certain d'avoir une quantité suffisante en produits de première PCR, 9µL et non 10µL, ont été déposés pour réaliser la PCR nichée.

Pour chaque gène, quatre mix ont été réalisés avec les quatre concentrations différentes en amorces. La PCR nichée a été faite séparément pour chaque gène.

Les résultats obtenus se trouvent sur les figures 16 et 17.

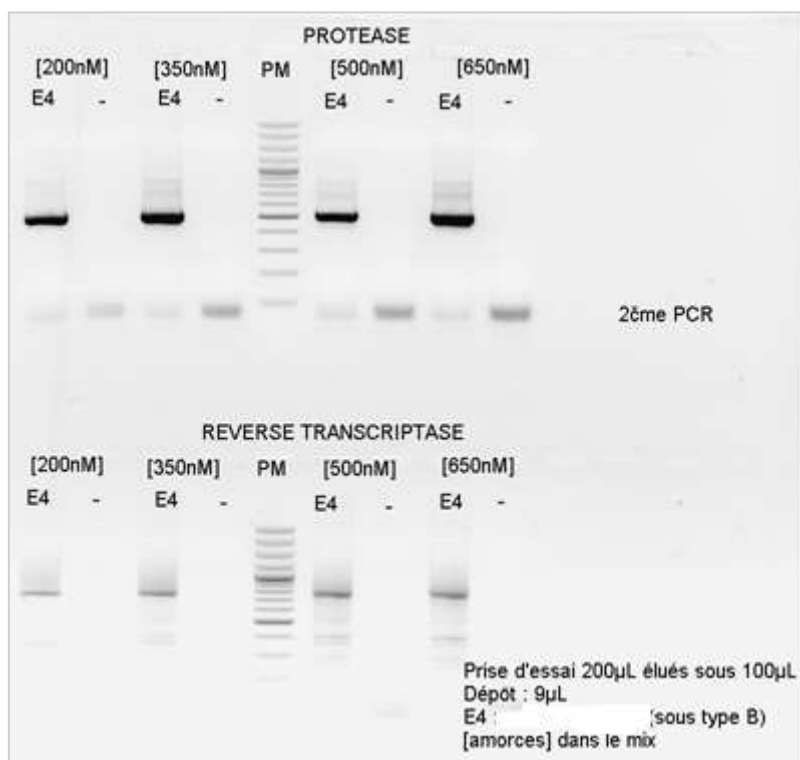


Figure 16 : Photo du gel avec les différentes concentrations en amorces en 2ème PCR pour les gènes Protéase et Réverse Transcriptase

Le gène de la protéase a été amplifié pour l'échantillon E4 quelle que soit la concentration en amorces. Il n'y a pas de différences d'intensité entre les bandes.

En revanche, pour le gène de la réverse transcriptase, les bandes sont plus intenses à 500nM et 650nM.

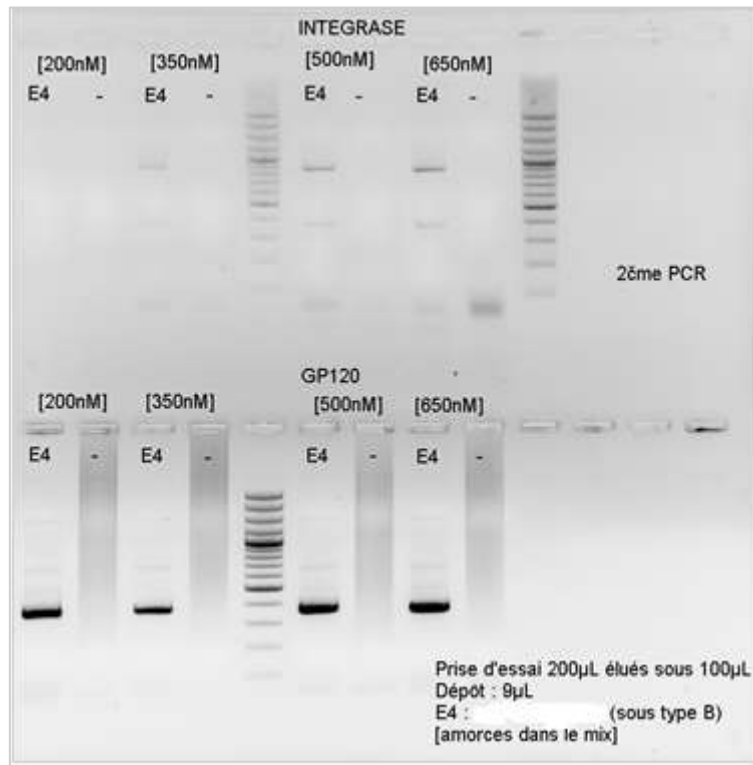


Figure 17 : Photo du gel avec les différentes concentrations en amorces en 2ème PCR pour les gènes Intégrase et Gp120

Le gène de l'intégrase n'a pas été amplifié à 200nM et très faiblement à 350nM. Cependant, la différence d'intensité des bandes est quasiment nulle entre 500 et 650nM.

De la même façon que pour la protéase, le gène de la gp120 a été amplifié quelle que soit la concentration en amorces utilisée.

Nous avons décidé de retenir la concentration finale en amorces de 500nM.

II. Validation du protocole sur les 18 échantillons

Après validation des conditions expérimentales décrites ci-dessus, les paramètres retenus ont été les suivants :

- Volume d'élution : 100µL
- Volume de dépôt : 10µL
- Température d'hybridation : 55°C
- Concentration en amorces : 500nM

Ces conditions expérimentales jugées « optimales » ont été testées sur l'ensemble des 18 échantillons que nous avons nommées protocole 1.

II.1. Amplification avec le protocole 1

Les échantillons E5 à E18 ont été extraits avec une prise d'essai de 200µL de sang total élués sous 100µL. Les extraits des échantillons E2 et E4 élués sous 100µL ont été réutilisés puisque leur amplification avait bien fonctionné lors de la mise au point. En revanche, les échantillons E1 et E3 ont été à nouveau extraits puisqu'aucun gène n'avait été amplifié précédemment.

Au cours du protocole 1, les manipulations n'ayant pas été réalisées par une personne expérimentée en techniques de biologie moléculaire, plusieurs essais ont dû être réalisés.

Essai n°1 :

Sur un total de **72** gènes (18 échantillons avec chacun 4 gènes) : **43** ont été amplifiés soit environ **60%**.

A titre d'exemple, les résultats obtenus pour les échantillons E1 à E4 sont présentés sur la figure 18. Les gènes pour lesquels l'amplification n'a pas fonctionné sont représentés par un cercle rouge.



Figure 18 : Photo du gel avec utilisation des conditions "optimales" pour les échantillons E1 à E4 (essai n°1)

Essai n°2 :

Pour cet essai, les deux PCR ont été réalisées gène par gène en reprenant uniquement les échantillons pour lesquels nous n'obtenions pas d'amplification totale sur les quatre gènes. Ceci, dans le but de diminuer la quantité de mix à préparer et le nombre de barrettes à utiliser pour limiter d'éventuelles erreurs de manipulation.

Sur les **29** gènes non amplifiés à l'essai n°1, **11** l'ont été à l'essai n°2.

A titre d'exemple, les résultats obtenus pour le gène de la protéase sont présentés sur la figure 19.

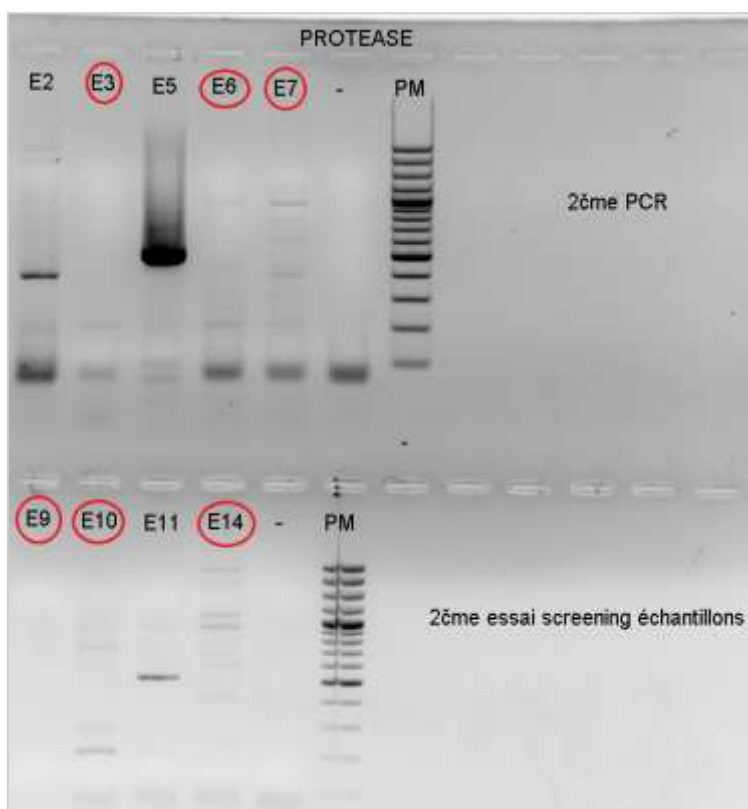


Figure 19 : Photo du gel lors de l'essai n°2 pour le gène Protéase

Essai n°3 :

Les échantillons E3, E9 et E10 pour lesquels les quatre gènes n'ont jamais été amplifiés aux essais n°1 et n°2, n'ont pas été testés à l'essai n°3 (soit 12 gènes).

Pour les 6 gènes restants non amplifiés aux essais n°1 et n°2, les échantillons correspondants ont été extraits une nouvelle fois en même temps et élués sous 100μL. Puis, les gènes ont été amplifiés ensemble au cours des réactions de PCR.

Sur les **6** gènes restants, **3** ont été amplifiés.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 20.

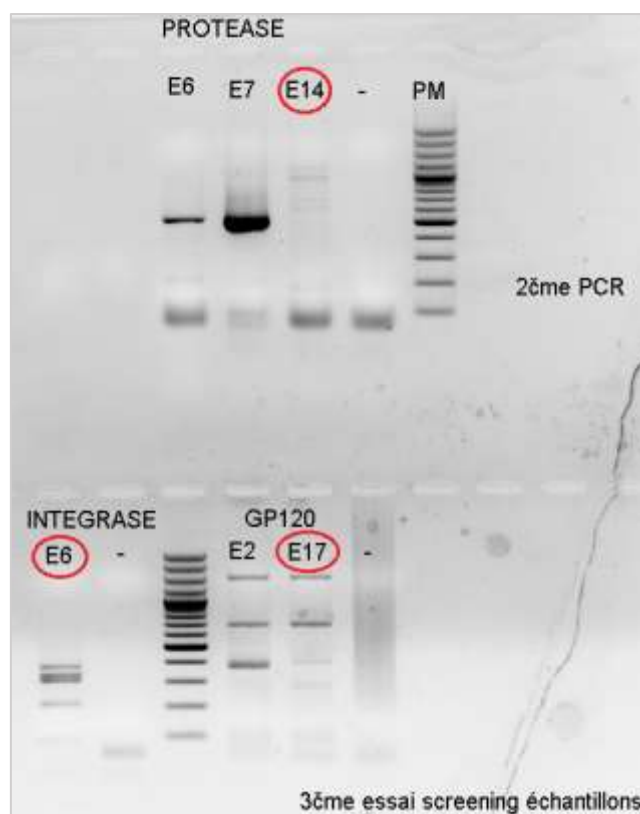


Figure 20 : Photo du gel lors de l'essai n°3

- *Bilan du Protocole 1*

Sur un total de **72** gènes, le protocole 1 a permis d'amplifier **57** gènes soit environ **79%**.

- Pour 12 des 18 échantillons, les 4 gènes ont été amplifiés
- Pour 3 des 18 échantillons, 1 seul gène n'a pas été amplifié
- Pour 3 des 18 échantillons, aucun gène n'a été amplifié.

II.2. Amplification avec le protocole 2 : élution sous 50µL

Après avoir analysé nos résultats, nous avons décidé de tester les six échantillons pour lesquels l'amplification des quatre gènes n'était pas complète, en modifiant le volume d'élution des extraits.

Les six échantillons ont donc été extraits avec une prise d'essai de 200µL de sang total élués sous 50µL. Un échantillon supplémentaire, (E12), dont les quatre gènes avaient été amplifiés dès l'essai n°1 du protocole 1, a été également extrait et élué sous 50µL pour servir de témoin positif. L'objectif était de déterminer si un extrait d'ADN plus concentré permettrait d'avoir de meilleurs résultats d'amplification. Pour chaque échantillon, les quatre gènes ont été testés.

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 21 et 22.

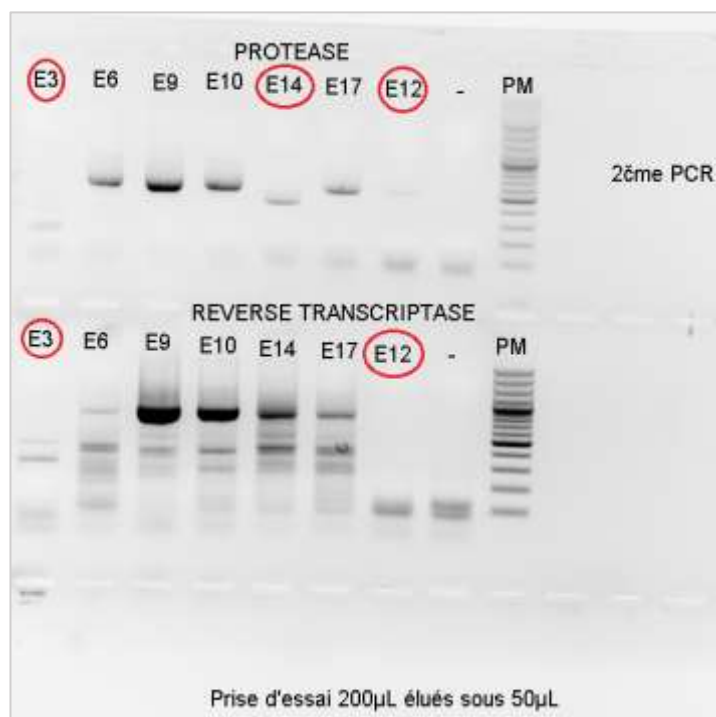


Figure 21 : Photo du gel lors du protocole 2 avec un volume d'élution de 50µL pour les gènes Protéase et Réverse Transcriptase

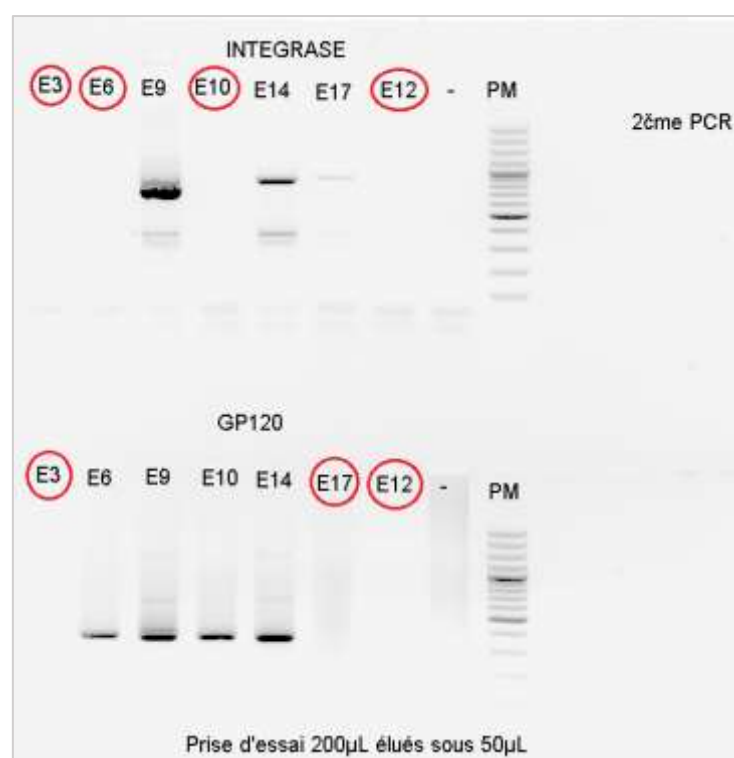


Figure 22 : Photo du gel lors du protocole 2 avec un volume d'élution de 50µL pour les gènes Intégrase et gp120

- *Bilan du protocole 2*

Parmi les **15** gènes non amplifiés à l'issu du protocole 1, **7** l'ont été avec le protocole 2.

Par contre, l'échantillon E12 servant de témoin positif dans cet essai, n'a pas été amplifié ainsi que certains gènes qui avaient été pourtant amplifiés précédemment.

Au total, on obtient un résultat d'amplification de **64** gènes sur **72** soit environ **89%**.

II.3. Amplification avec le protocole 3 : amorces utilisées en routine à Angers

Après analyse des résultats du protocole 2, il ne restait que très peu de gènes non amplifiés sur un nombre restreint d'échantillons. Notre dernière tentative a consisté à préparer les mix de PCR avec les amorces habituellement utilisées en routine. A la différence de celles utilisées précédemment pour la première PCR, il s'agit du même couple d'amorce pour le gène de la protéase et de la reverse transcriptase.

Les échantillons concernés et le témoin positif (E12) ont été une dernière fois extraits et élués sous 50µL.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 23.

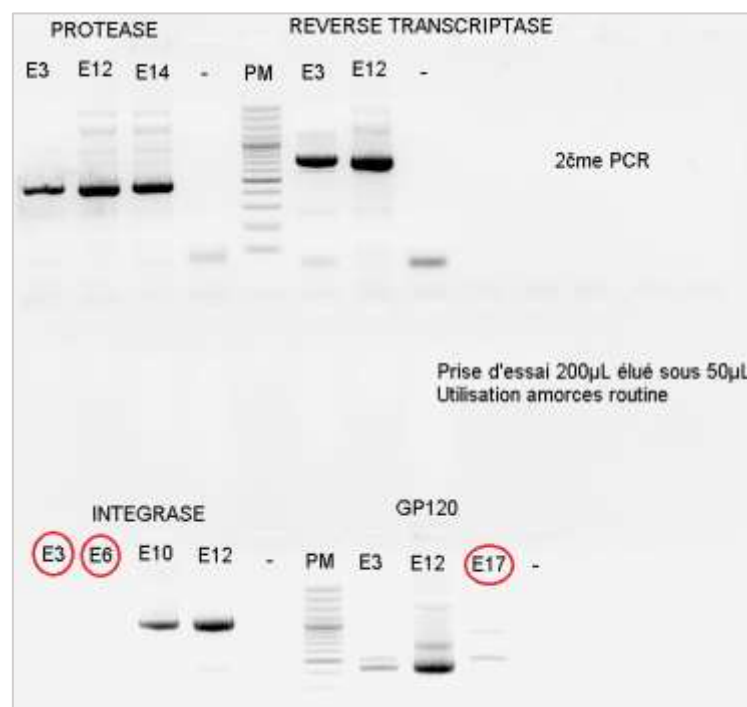


Figure 21 : Photo du gel après utilisation des amorces de routine lors du protocole 3

- *Bilan du protocole 3*

Sur les **8** gènes restants non amplifiés à l'issu du protocole 2, **5** l'ont été avec le protocole 3. Au final, on obtient un résultat d'amplification de **69** gènes sur **72** soit environ **96 %**.

II.4. Synthèse des résultats de l'amplification : bilan des 3 protocoles

Les résultats de l'amplification des 18 échantillons après l'utilisation des trois protocoles décrits précédemment sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats de l'amplification pour les 18 échantillons après les 3 protocoles expérimentaux

Protocole	Prise d'essai (μl)	Elution (μL)	Amorces	Amplification		
				Nombre de gènes	Pourcentage de gènes	Echantillons avec 4 gènes amplifiés
1	200	100	Nantes	57/72	79 %	12/18
2	200	50	Nantes	64/72	89 %	13/18
3	200	50	Angers	69/72	96 %	15/18

L'ingénieur du laboratoire est intervenu pour améliorer encore ces résultats. En utilisant le **protocole 2** (200μL de prise d'essai et 50μL d'élution), elle a pu obtenir l'amplification de 2 gènes supplémentaires.

Le résultat final de l'amplification est de **71** gènes sur **72** soit presque **99%**.

Le seul gène qui n'a jamais été amplifié est le gène de la gp120 pour l'échantillon E17.

III. Résultats du séquençage

III.1. Comparaison de la performance du séquençage à Angers et à Nantes

Les deux laboratoires utilisent la même technique de séquençage, celle de Sanger. Des différences entre les réactifs et/ou le séquenceur utilisés pourraient exister mais nous ne disposons pas de ces informations.

A Angers, le séquençage des échantillons a été réalisé par l'ingénieur du laboratoire de virologie. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Comparaison des résultats du séquençage des 18 échantillons à Angers et à Nantes

Résultats		Séquençage des gènes			
		Protéase	Réverse T	Intégrase	Gp120
Nombre de gènes séquencés	Angers	17/18	15/18	17/18	16/17
	Nantes	18/18	18/18	15/17	14/17

NB : Le séquençage du gène de l'intégrase et la détermination du génotropisme pour l'échantillon E4 n'ont pas été réalisés à Nantes. De même pour le génotropisme de l'échantillon E17 à Angers.

III.2. Comparaison des mutations de résistance identifiées

L'ensemble des mutations de résistance identifiées à Angers et à Nantes ont été analysées. Pour chaque gène par échantillon, un profil de résistance aux différents traitements antirétroviraux a été déterminé. Les résultats de ces mutations pour les 4 classes thérapeutiques INTI, INNTI, IP et INI se trouvent en annexe 7, 8, 9 et 10.

Pour synthétiser, les résultats chiffrés sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Comparaison des mutations de résistances identifiées à Angers et à Nantes

Résultats		Détection des mutations de résistance			
		Protéase	Réverse T		Intégrase
			INRT	INNRT	
Nombre total de mutations détectées	Angers	64	20	11	2
	Nantes	71	16	5	2
Nombre de mutations en commun		47	7	5	1
Résultats d'interprétation identiques		8/16	10/15	12/15	12/14

NB : En considérant que la comparaison entre les deux laboratoires est impossible pour certains échantillons pour lesquels l'amplification a échoué ou le séquençage est incomplet ; soit 3 échantillons pour la RT, 2 pour la PR et 4 pour l'INT.

Le tableau 12, synthétise les résultats d'interprétation des mutations.

Tableau 12 : Synthèse des résultats d'interprétation des mutations de résistance

Echantillons	Laboratoire	Résistances aux antirétroviraux				Impact clinique O/N (classe impactée)
		INTI	INNTI	IP	INI	
E1	Angers	SI	SI	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	NFV	Aucune	
E2	Angers	Aucune	Aucune	SI	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	
E3	Angers	Aucune	Aucune	SQV/r-ATV/r	ES	N
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r-ATV/r	Aucune	
E4	Angers	ZDV-3TC/FTC-d4T-ABC-TDF	Aucune	Aucune	Aucune	O (INTI)
	Nantes	Aucune	Aucune	Aucune	NR	
E5	Angers	ZDV-d4T-ABC-TDF	Aucune	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Tous les INTI	Aucune	ATV/r	AA	
E6	Angers	ZDV-3TC/FTC-ddI-d4T-ABC-TDF	ETR-RPV	SQV/r	Aucune	O (INTI-INNTI-IP)
	Nantes	Aucune	Aucune	IDV-SQV/r-NFV-FPV/r-LPV/r-ATV/r	Aucune	
E7	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	NFV	Aucune	
E8	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r	Aucune	
E9	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r	Aucune	

Echantillons	Laboratoire	Résistances aux antirétroviraux				Impact clinique O/N (classe impactée)
		INTI	INNTI	IP	INI	
E10	Angers	Aucune	RPV	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	RPV	Aucune	Aucune	
E11	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	RAL-EVG-DTG	O (INI)
	Nantes	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	
E12	Angers	Aucune	Aucune	SQV/r	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r	Aucune	
E13	Angers	SI	SI	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	
E14	Angers	ZDV-3TC/FTC-d4T-ABC-ddI	EFV-NVP-ETR-RPV	IDV-NFV-FPV/r-DRV/rQD-LPV/r-ATV/r	Aucune	O (INTI-INNTI)
	Nantes	3TC/FTC	Aucune	AA	AA	
E15	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	O (INTI-IP)
	Nantes	ABC-3TC/FTC-d4T-ZDV	Aucune	IDV-SQV/r-NFV-FPV/r-LPV/r-ATV/r	Aucune	
E16	Angers	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	N
	Nantes	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	
E17	Angers	SI	SI	IDV-SQV/r-NFV-LPV/r-ATV/r	Aucune	O (INI)
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r	EVG	
E18	Angers	Aucune	EFV-NVP	SQV/r	Aucune	O (INNTI)
	Nantes	Aucune	Aucune	SQV/r	Aucune	

(Aucune résistance ; Résistance possible ; Résistance ; O = Oui ; N = Non ; SI = Séquençage incomplet ; AA = Absence d'amplification ; NR = Non réalisé ; ES = Echec du Séquençage)

Liste des abréviations de molécules :

INTI :

ZDV = zidovudine
3TC = lamivudine
FTC = emtricitabine
ddI = didanosine
d4T = stavudine
ABC = abacavir
TDF = ténofovir

IP :

IDV = indinavir
SQV = saquinavir
NFV = nelfinavir
RTV = ritonavir ; (/r) = boosté par le ritonavir
FPV = fosamprénavir
LPV = lopinavir
ATV = atazanavir
DRV = darunavir

INNTI :

EFV = efavirenz
NVP = nevirapine
ETR = etravirine
RPV = rilpivirine

INI :

RAL = raltégravir
EVG = elvitégravir
DTG = dolutégravir

III.3. Comparaison des sous-types et tropismes

Le tableau 13 présente les résultats de détermination des tropismes et sous-types du virus dans les deux laboratoires.

Tableau 13 : Comparaison des sous-types et tropismes identifiés à Angers et à Nantes

Echantillon	Laboratoire	Sous-type du virus	Tropisme
E1	Angers	B	CXCR4
	Nantes	B	CXCR4
E2	Angers	CRF02_AG	CXCR4
	Nantes	CRF02_AG	CXCR4
E3	Angers	CRF02_AG	CCR5
	Nantes	CRF02_AG	CCR5
E4	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	Non réalisé
E5	Angers	B	Non concluant
	Nantes	B	CXCR4
E6	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	CCR5
E7	Angers	CRF01_AE	CXCR4
	Nantes	CRF01_AE	Non concluant
E8	Angers	B	CXCR4
	Nantes	B	CXCR4
E9	Angers	B	CXCR4
	Nantes	B	CXCR4
E10	Angers	B	CXCR4
	Nantes	B	CXCR4
E11	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	CXCR4
E12	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	CCR5
E13	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	CXCR4
E14	Angers	B	CXCR4
	Nantes	B	CXCR4
E15	Angers	B	CCR5
	Nantes	B	CCR5
E16	Angers	G-like	CCR5
	Nantes	CRF14_BG	Non concluant
E17	Angers	A-like	Non réalisé
	Nantes	Non typable	Non concluant
E18	Angers	CRF02_AG	CCR5
	Nantes	CRF02_AG	CCR5

A l'exception de l'échantillon E17 pour lequel Nantes n'a pas pu obtenir le sous-type, les résultats entre les deux laboratoires sont identiques pour tous les échantillons (on considère G-like et CRF14_BG comme appartenant au même sous-groupe G).

Pour la détermination du tropisme, les résultats sont discordants pour 2 échantillons.

NB : *En considérant que les résultats ne sont pas interprétables pour 5 échantillons pour lesquels le test de tropisme n'a pas été réalisé ou est non concluant.*

PARTIE 4. DISCUSSION

I. Les résultats de détermination des conditions expérimentales

Pour mettre au point la technique de génotypage de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux à partir de l'ADN proviral au laboratoire de virologie du CHU d'Angers, nous avons dû dans un premier temps, valider les conditions expérimentales. Trois paramètres importants ont dû être déterminés :

- Le volume d'élution et le volume de dépôt de l'extrait d'ADN
- La température d'hybridation des amorces
- La concentration en amorces

I.1. Les conditions expérimentales sont-elles vraiment optimales ?

Volume d'élution et volume de dépôt :

Les résultats ont montré que l'amplification des gènes fonctionnait davantage avec un volume de dépôt de 10µL d'extrait et un volume d'élution de l'extrait d'ADN de 100µL. En effet, une concentration trop importante en ADN dans le mélange réactionnel peut gêner la réaction de PCR et entraîner l'apparition de « bandes parasites » sur le gel d'électrophorèse.

Température d'hybridation :

Les tentatives d'augmentation de la température d'hybridation pour la première PCR n'ont pas donné de meilleurs résultats. Bien que l'intensité des bandes sur les gels d'agarose semble montrer une meilleure amplification lorsque la température est plus élevée, l'amplification n'a fonctionné pour tous les gènes testés qu'à la température de 55°C. Pourtant, plus la température est élevée, moins le risque d'hybridation non spécifique est important. En revanche, avec une température trop élevée, la sensibilité est diminuée car la stringence est augmentée. La température optimale est donc celle qui permet de trouver le juste équilibre entre spécificité et sensibilité.

Concentration en amorces :

Les concentrations en amorces de 500nM et 650nM ont montré des résultats d'amplification nettement supérieurs. Par contre, la différence entre ces deux concentrations est faible.

Le risque, en utilisant une concentration trop élevée, est que les amorces s'hybrident sur elles-mêmes ou entre elles pour former des dimères d'amorces (bandes parasites) donnant des produits de PCR non spécifiques. C'est pourquoi le choix s'est porté vers la concentration de 500nM. De plus, si la concentration de 500nM est suffisante, il n'est pas nécessaire d'utiliser davantage de réactifs qui augmenteraient le coût.

Nous avons validé ces conditions expérimentales pour poursuivre la mise au point de la technique. Elles ont été jugées « optimales » dans le sens où pour chaque paramètre, nous avons sélectionné le meilleur résultat d'amplification. Cependant, il faut prendre en considération que je n'étais pas expérimentée en biologie moléculaire pour réaliser ces expérimentations.

II. Les résultats de validation du protocole 1 sur les 18 échantillons

Après avoir validé les conditions expérimentales, l'objectif était de tester ce protocole sur nos 18 échantillons de sang total correspondant à 72 gènes (4 par échantillons).

Les manipulations permettaient d'amplifier 7 échantillons à la fois ce qui représentait un nombre important de puits à utiliser sur chaque barrette. Quatre mix différents devaient être préparés pour chaque PCR. La technique nécessitait donc une très grande précision et concentration pour limiter au maximum les erreurs.

Avec le protocole 1, trois essais ont été nécessaires pour obtenir un résultat d'amplification de 57 gènes sur 72 soit 79%. Pour les 15 gènes restant, deux modifications ont été nécessaires. D'abord, le changement du volume d'élution à 50µL pour avoir un extrait d'ADN plus concentré, a permis d'amplifier 9 gènes supplémentaires (protocole 2). Ensuite, les amorces ont été remplacées par celles utilisées en routine pour le séquençage sur l'ARN ce qui a permis d'amplifier 5 nouveaux gènes (protocole 3). C'est seulement à ce stade que nous obtenons un résultat d'amplification de 71 gènes sur 72 soit presque 99 %.

Notre protocole a donc été remis en question. Il n'a permis d'amplifier que 57 gènes sur 72. Pour obtenir de meilleurs résultats il faut envisager de retenir le volume d'élution de 50µL. De plus, le protocole 3 avec les amorces de routine, sera un protocole de seconde intention à utiliser lorsque les résultats ne seront pas satisfaisants. La question se pose de savoir s'il est acceptable d'avoir à relancer des manipulations en routine pour les échantillons dont l'amplification n'a pas fonctionné sur les 4 gènes. La situation sera examinée au cas par cas, une deuxième tentative sera en général réalisée, et en cas de nouvel échec, un nouveau prélèvement est demandé au

service prescripteur. Ces situations font systématiquement l'objet d'une analyse critique sur le plan technique et clinique avec le biologiste.

III. Les résultats du séquençage sur l'ADN proviral

III.1. Les limites du séquençage direct

Pour obtenir nos résultats, nous avons utilisé le séquençage direct avec la méthode de Sanger. Bien qu'il s'agisse de la technique standard génotypique, elle ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant au moins 20% de la population virale totale circulante. Actuellement, les techniques de séquençage haut débit, qui permettent la détection des populations virales minoritaires, ne sont pas utilisées en pratique clinique et sont réservées aux protocoles de recherche. Or, avant la mise en place d'un traitement, les variants résistants peuvent être minoritaires dans la population virale.

Il existe d'autres techniques de mise en évidence de populations minoritaires telles que les PCR spécifiques d'allèles muté, les techniques de génotypage sur clones ou le séquençage de dernière génération dit « à haut débit ». [90] Ces méthodes plus sensibles, permettent de détecter les variants représentant seulement 0,1 à 1% de la population virale. De plus, une étude comparant le séquençage à haut débit avec la méthode de Sanger, a montré que le nombre de mutations détectées est plus important avec cette dernière génération. Cependant, le temps nécessaire pour la réalisation du séquençage est bien plus élevé ce qui limite son introduction en routine dans les laboratoires de virologie. [91]

Par conséquent, il est probable que certaines mutations n'aient pas pu être détectées avec la méthode de séquençage direct que nous avons utilisée. Ces méthodes plus sensibles, permettraient d'obtenir des résultats plus complets. Elles pourraient être utiles pour détecter les populations virales minoritaires en pré-thérapeutique mais restent aujourd'hui très coûteuses par rapport au bénéfice qu'elles apportent.

III.2. Intérêts et limites du séquençage sur l'ADN proviral

L'objectif de notre travail, était de mettre en place une technique de génotypage de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux à partir de l'ADN proviral. Une fois le protocole au point et jugé performant, le laboratoire de virologie du CHU d'Angers devra le tester sur l'ARN à partir d'échantillons de plasma et comparer les résultats à ceux que nous avons obtenus.

Ceci, dans le but d'avoir une technique unique adaptée aux deux matrices et utilisable quelle que soit la charge virale du patient.

Les tests génotypiques élaborés à partir de l'ARN, présentent certaines limites. En effet, ces tests peuvent échouer lorsque la charge virale plasmatique est trop faible ou indétectable. Par exemple, deux kits commercialisés, *ViroSeq HIV-1* et *TruGene HIV-1* ne peuvent pas réaliser le génotypage dès lors que la charge virale est inférieure à 1000 copies/mL. Actuellement, le kit *TruGene* n'est plus commercialisé par Siemens.

Le recours au génotypage à partir de l'ADN proviral semble à première vue être une alternative intéressante. En effet, il existe une corrélation chez les patients traités entre les mutations de résistance détectées dans l'ARN plasmatique et celles de l'ADN proviral présent dans les cellules sanguines mononuclées périphériques. Cela suggère que les deux compartiments sont appropriés pour la détection des mutations. *Novitsky et al*, ont montré qu'il était possible à partir d'un protocole existant, [92] en modifiant certains paramètres tels que la nature des amorces où les conditions de la PCR, de mettre au point une technique de génotypage à long terme applicable sur l'ARN et l'ADN. [93]

Le risque d'échec virologique chez les patients déjà traités intensivement, ayant une charge virale bien contrôlée, et pour lesquels un changement de traitement est envisagé, est important si les résistances préexistantes aux antirétroviraux ne sont pas prises en compte. D'où, la nécessité que les tests génotypiques basés sur l'ADN cellulaire puissent détecter les mêmes mutations que ceux sur l'ARN plasmatique. Cependant, *Delaugerre et al*, ont réalisé une étude portant sur des patients ayant eu précédemment plusieurs échecs virologiques mais dont le traitement actuel permet de rendre la charge virale indétectable. Dans cette étude, les tests de résistances à partir de l'ADN proviral étaient moins sensibles. Moins de mutations étaient détectées à partir de l'ADN par rapport au cumul des résultats réalisés antérieurement sur l'ARN. [94] C'est dans cette situation que le séquençage haut débit devrait être envisagé pour améliorer la détection des mutations.

Même si les tests sur l'ARN restent la méthode de référence pour l'étude des mutations, l'utilisation de l'ADN doit être envisagée. En effet, elle permet de détecter certaines mutations supplémentaires, non identifiées sur l'ARN, à l'origine de résistances à certains traitements ayant une faible barrière génétique. [95] De plus, même après plusieurs années de succès virologique, des virus « archivés » dans les cellules sanguines mononuclées ou d'autres réservoirs, sont porteurs de mutations associées aux résistances. Ils peuvent persister et évoluer sur de longues périodes et rendent obligatoire l'utilisation des techniques basées sur l'ADN. [96]

Enfin, pour les patients traités et contrôlés depuis longtemps, le laboratoire ne conserve pas toujours d'échantillons de plasma congelés avec une charge virale détectable. Le génotypage sur l'ADN proviral devient alors le seul moyen d'évaluer le niveau de résistance d'une souche virale.

III.3. Performance de la technique de séquençage

Nous remarquons dans les résultats, que sur les 71 gènes amplifiés par la technique de PCR, tous n'ont pas été séquencés ensuite. En effet, à Angers, le séquençage a échoué pour 6 gènes (le gène restant non amplifié n'a pas été séquencé), même après plusieurs essais. Pourtant, pour chacun de ces gènes, les résultats d'amplification après PCR, révélés sur gel d'agarose, avaient montré la présence d'une bande caractéristique. Il est probable que dans les échantillons utilisés, la quantité et/ou la qualité de l'ADN amplifié n'étaient pas suffisantes pour permettre le séquençage complet de ces gènes.

Ainsi, même si le protocole d'amplification semble fonctionner, il ne permet pas dans tous les cas, de réaliser le séquençage.

Par rapport à Nantes, notre protocole semble moins performant pour le séquençage des gènes de la protéase et de la reverse transcriptase. En revanche, il l'est davantage pour les gènes de l'intégrase et de la gp120. Cependant, il faut considérer que nous avons effectué cette méthode sur un petit nombre d'échantillons. Il serait intéressant de réaliser la technique à partir d'un nombre plus important d'échantillons de sang total pour voir si les différences de performance entre les deux laboratoires se confirment.

III.4. Les mutations de résistance identifiées

III.4.1. Mutations identifiées et données de la littérature

- *Profils des mutations de résistance aux INTI identifiées à Angers et/ou Nantes*
 - **M184V/I** : les plus courantes, ces mutations sont sélectionnées et réduisent fortement la sensibilité du virus à plusieurs molécules : lamivudine/emtricitabine (3TC/FTC), et plus faiblement à l'abacavir. La substitution d'une méthionine (M) par une valine (V), gêne l'incorporation du 3TC/FTC au niveau du site catalytique de l'enzyme, générant la résistance à cette molécule. Qu'il s'agisse du laboratoire de Nantes ou d'Angers, la

détection d'une de ces mutations a bien conduit au résultat de résistance attendu. Malgré la présence de ces résistances, il est de pratique courante de poursuivre ces traitements. En effet, le maintien de ces mutations diminue l'aptitude du virus à se multiplier et augmente sa sensibilité à d'autres molécules telles que la zidovudine ou le ténofovir.

- **L74I, Y115F** : fréquentes, elles sont sélectionnées en premier par l'abacavir et secondairement par le ténofovir.
- **M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q/E** : appelées Thymidine Analogue Mutations (TAMs), elles sont sélectionnées par la zidovudine et la stavudine et affectent la réponse virologique à ces molécules. Elles confèrent à plus bas niveau, des résistances croisées au ténofovir et à l'abacavir.
- **Insertion au codon T69** : en association avec plusieurs TAMs, cette mutation est responsable d'un haut niveau de résistance à la zidovudine, abacavir et ténofovir et d'un niveau intermédiaire de résistance à la lamivudine/emtricitabine. [71]

Les mutations majeures de résistance aux INTI sont résumées sur la figure 24. En fonction des molécules, l'impact des mutations sur la réponse virologique peut être variable.

Major Nucleoside RT Inhibitor (NRTI)-Resistance Mutations													
	Non-TAMs					TAMs						MDR	
Cons	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T	Q
3TC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
FTC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
ABC	VI	R	E	<u>VI</u>	E	L			W	YF		Ins	M
TDF	***	R	E		F	L			W	YF		Ins	M
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	<u>YE</u>	QE	Ins	M

Figure 22 : Synthèse des mutations de résistance aux INTI [71]

- *Profils des mutations de résistance aux INNTI identifiées à Angers et/ou Nantes*
- **K103N, Y181C, G190A** : les plus courantes, elles sont responsables d'une résistance haute ou intermédiaire à la nevirapine mais aussi à l'efavirenz. [71]
- **H221Y, M230I, Y181C** : elles font parties des 15 mutations associées à une diminution de la sensibilité du virus à la rilpivirine.
- **V90I** : elle est associée à la résistance à l'étravirine. [97]

Les mutations majeures de résistance aux INNTI sont résumées sur la figure 25.

Major Non-Nucleoside RT Inhibitor (NNRTI)-Resistance Mutations											
	100	101	103	106	138	179	181	188	190	227	230
Cons	L	K	K	V	E	V	Y	Y	G	F	M
NVP	I	PEH	NS	AM		DEF	CIV	LCH	ASEQ	LC	L
EFV	I	PEH	NS	AM		DEF	C	LCH	ASEQ	LC	L
ETR	I	PEH					CIV		EQ	C	L
RPV	I	PEH			KAGQ	DEF	CIV	L	EQ	C	L

Figure 23 : Synthèse des mutations de résistance aux INNTI [71]

- *Profils des mutations de résistance aux IP identifiées à Angers et/ou Nantes*
- **I84V, N88S** : ce sont les mutations ayant l'impact le plus important sur la réponse virologique à l'atazanavir/r.
- **V32I, I47V, I84V** : la présence de deux ou plus de ces mutations est à l'origine d'une diminution de la réponse virologique au darunavir/r.
- **D30N** : pour certains virus de sous-type non B, cette mutation est moins fréquemment sélectionnée que les autres et confère la résistance au nelfinavir. [97]
- **V32I, M46I, V82A, L90M** : la combinaison de plusieurs de ces mutations dites « primaires » est une des plus fréquentes chez les patients atteints par le VIH. Elles sont responsables de la résistance à l'atazanavir/r, fosamprenavir/r, indinavir/r, lopinavir/r.
- **I15V, M36I, I54V, L63P, A71I** : appelées mutations secondaires, elles apparaissent chez plus de 25 % des patients. [98]
- **H69K, L89M/I** : elles entraînent uniquement la résistance au tipranavir. (même si les mutations sont détectées, les deux laboratoires ne rendent pas d'interprétation de résistance au tipranavir).
- **L10I/V, I62V, G73S, V77I** : elles sont impliquées dans la résistance au saquinavir. [97]

Les mutations majeures de résistance aux IP sont résumées sur la figure 26.

Major Protease Inhibitor (PI) Resistance Mutations												
Cons	24 L	32 V	46 M	47 I	48 G	50 I	54 I	76 L	82 V	84 I	88 N	90 L
ATV/r		I	IL	V	VM	L	VTAM		ATSF	V	S	M
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V		
LPV/r	I	I	IL	VA	VM	V	VTALM	V	ATSF	V		M

Figure 24 : Synthèse des mutations de résistances aux IP [71]

- *Profils des mutations de résistance aux INI identifiées à Angers et/ou Nantes*
- **L74I/M, E138K** : il s'agit de mutations mineures, elles nécessitent d'être combinées à d'autres mutations pour impacter la réponse du virus au dolutégravir et au raltégravir. [97]
- **G118R** : elle est à l'origine de plusieurs niveaux de résistance au raltégravir et à l'elvitégravir. [99]

Les mutations majeures de résistance aux INI sont résumées sur la figure 27.

Major Integrase Strand Transfer Inhibitor (INSTI)-Resistance Mutations								
Cons	66 T	92 E	138 E	140 G	143 Y	147 S	148 Q	155 N
RAL	A	Q	KA	SAC	CRH		HRK	H
EVG	IAK	Q	KA	SAC		G	HRK	H
DTG		Q	KA	SAC			HRK	

Figure 25 : Synthèse des mutations de résistance aux INI [71]

III.4.2. Comment expliquer les différences de résultats entre Angers et Nantes ?

Le nombre total de mutations détectées par gène est différent entre les deux laboratoires. La technique utilisée par le laboratoire d'Angers, a permis de détecter plus de mutations pour les 4 gènes (97 au total contre 94 à Nantes).

Nous avons ainsi différentes situations observées :

- **Des mutations sont détectées à Angers mais pas à Nantes** (12/97) ou inversement (7/94), dans ces cas, aucune mutation commune n'est retrouvée. Par conséquent, le profil de résistance aux traitements n'est pas le même.

Pour l'interprétation des mutations, le laboratoire d'Angers a utilisé la version n°25 de l'algorithme de l'ANRS-AC11 datant de septembre 2015. En revanche, à Nantes c'est la version n°24 de septembre 2014 qui a été choisie. Le changement de version pourrait expliquer en partie l'absence de détection de certaines mutations.

Nous ne disposions pas des séquences obtenues à Nantes. Nous avons donc comparé les résultats avec les données envoyées par le CHU de Nantes. Or, les logiciels d'interprétation ne sont pas fiables à 100%, il est souvent nécessaire de contrôler visuellement les séquences. [89]

Nous pouvons supposer que pour certains échantillons, la quantité de matrice ADN dans le mélange réactionnel était moins importante ou insuffisante pour un des deux laboratoires, ce qui pourrait expliquer cette différence d'identification des mutations.

Nous pouvons également nous interroger sur l'efficacité de l'étape de purification des produits de la PCR de séquence. En effet, si elle n'est pas réalisée correctement, cela peut impacter la lecture au séquenceur. La plupart des différences entre Angers et Nantes résulte de la détection de doubles populations sur certaines positions. Cela signifie que plusieurs acides-aminés sont présents (par exemple la mutation A71V/A/I/T). Sur l'électrophorégramme, cette situation s'observe par plusieurs pics donnant un « bruit de fond ». Celui-ci est typique de la méthode de Sanger, il remet en cause la qualité de la séquence à analyser et peut être dû à une mauvaise étape de purification.

- **Les mêmes mutations sont détectées** et dans ce cas, le profil de résistance est le même (22/191).
- **Des mutations différentes sont détectées et pourtant le profil de résistance est le même** (2/191). En effet, une résistance peut être engendrée par la substitution d'un acide-aminé par des acides-aminés différents sur la même position. C'est le cas pour l'échantillon E10. La résistance à la rilpivirine, peut faire suite à la substitution de la méthionine (M) en position 230 par une valine (V) ou une isoleucine (I). [100]
- **Des mutations communes sont détectées mais un des deux laboratoires présente des mutations supplémentaires** (102/191) qui complètent ou non le profil de résistance. Davantage de molécules peuvent alors être impliquées.
- **Des mutations sont détectées et pourtant, aucune résistance n'est identifiée** (35/191). Il s'agit de mutations mineures qui seules, ne sont pas capables d'entraîner

une résistance. Elles ne font qu'impacter la réponse virologique à certaines molécules. Elles nécessitent d'être combinées avec d'autres mutations pour être à l'origine d'une résistance.

- **Aucune mutation n'est détectée**, dans ce cas, aucune résistance n'est identifiée.
- **Le séquençage est incomplet, non réalisé ou l'amplification a échoué** en amont. La comparaison des résultats pour l'échantillon concerné est donc impossible.

Nous pouvons faire une synthèse des conséquences cliniques : pour 7 échantillons, il y a une différence sur l'interprétation d'une classe au moins qui peut conduire à une stratégie thérapeutique différente. Ces situations sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Origine des différences d'interprétation ayant un impact clinique. Le centre où est trouvée la différence est identifié (A) : Angers et (N) : Nantes.

Echantillon	Classe thérapeutique			
	INTI	INNTI	IP	INI
E4	Doubles populations (A)			
E6	Doubles populations (A)	Doubles populations (A)	Doubles populations (N)	
E11				Doubles populations (A)
E14	TAMS (A)	1 mutation majeure (A)		
E15	Doubles populations (N)		Double populations (N)	
E17				1 mutation majeure (N)
E18		Double population sur 1 mutation majeure (A)		

La différence repose donc essentiellement sur la présence de doubles populations (voire triples ou quadruples dans plusieurs cas) qui sont liées à la fois à la qualité du séquençage (purification, erreur ponctuelle), à la présence de différentes sous-populations et à la sensibilité de la technique. Cette analyse montre aussi les limites de l'usage et de l'interprétation du génotype sur ADN proviral en pratique clinique.

III.5. Tropisme et sous-types du virus

Tropisme :

Les résultats de détermination du tropisme du virus sont concordants pour 11 échantillons sur 13 interprétables entre Angers et Nantes.

A Angers, pour 9 échantillons, le virus présente une affinité pour le corécepteur transmembranaire CCR5 qui permet son entrée dans la cellule cible. Ainsi, l'utilisation du maraviroc, antagoniste du corécepteur, en traitement comme inhibiteur d'entrée du virus est possible. En général, plus de 80% des patients sont initialement infectés par des virus à tropisme exclusivement R5. Les virus à tropisme X4, présentant à leur surface le corécepteur transmembranaire CXCR4 émergent le plus souvent à des stades plus tardifs de l'infection. Ils représentent environ 50% des patients infectés pour lesquels, le maraviroc ne devra pas être utilisé en traitement. [71] Nous avons pu déterminer ce tropisme pour 7 échantillons.

Finalement, les résultats sont discordants pour 2 échantillons. Pourtant, les deux laboratoires, ont utilisé la même méthode génotypique Geno2pheno (version 2.5). Cette technique récente, consiste à séquencer la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus. Mais, il s'agit d'une région hypervariable de la protéine où de simples mutations en position 11 et 25 de la boucle font basculer le virus vers un tropisme X4. L'analyse et l'interprétation de la séquence de la boucle V3 s'effectuent uniquement à l'aide d'algorithmes de prédiction. [71] Le laboratoire de Nantes a utilisé en plus, le système d'interprétation webPSSM dont la modification récente, a permis d'augmenter la sensibilité de détection des virus à tropisme X4. [101] Ces différentes raisons pourraient expliquer en partie les deux discordances de tropisme identifiées dans nos résultats. Ces méthodes génotypiques, restent dans tous les cas plus accessibles, moins coûteuses et plus rapides que les techniques phénotypiques. Enfin, il ne faut pas perdre de vue que nous travaillons sur l'ADN proviral, que la technique est moins sensible et peut expliquer que nous n'obtenions pas toujours les mêmes résultats qu'à Nantes.

Sous-types :

Concernant les sous-types viraux identifiés, ils sont les mêmes à Angers et à Nantes pour tous les échantillons à l'exception de l'échantillon E17 pour lequel le résultat est rendu « non typable » par Nantes. Le sous-type B est prédominant (12/17) même si l'analyse s'est portée sur un petit nombre d'échantillons. En effet, ce sous-type représente plus de 60% des souches du virus en Europe. [71] Parmi les non-B, nous retrouvons majoritairement le sous-type CRF02_AG (3/5). Parmi les 79 CRFs décrits, il est responsable du plus grand nombre

d'infections à travers le monde. Il prédomine en Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest où il est à l'origine d'environ 50% des infections au VIH-1. [102]

Le sous-type a-t-il un impact sur la résistance ?

Les traitements ARV présentent la même efficacité qu'il s'agisse d'un virus de sous-type B ou non B. Chaque mutation à l'origine d'une résistance pour un virus de sous-type B, engendrera la même résistance pour un sous-type non B. Cependant, plusieurs mutations apparaissent préférentiellement chez certains sous-types. Par exemple, les virus de sous-type C, développent davantage la mutation K65R impliquée dans la résistance aux INTI, que les autres sous-types. Dans nos résultats, cette mutation n'apparaît pas et aucun sous-type C parmi nos 18 échantillons n'a été déterminé. [71]

IV. Conclusion du travail expérimental et pistes d'amélioration

Nous avons mis au point une technique permettant de déterminer le génotype de résistance du VIH-1 sur ADN proviral. Nous avons utilisé 18 échantillons pour lesquels un résultat était disponible au CHU de Nantes qui réalise actuellement ces analyses pour le CHU d'Angers. Nos résultats montrent une concordance sur la majorité des gènes amplifiés. Néanmoins, nous avons 11 différences qui auraient un impact potentiel sur la stratégie thérapeutique qui serait choisie. Ces discordances peuvent s'expliquer par la qualité de la technique de séquençage utilisée (purification, erreurs ponctuelles de séquençage, quantité et qualité de l'ADN dans l'échantillon) mais aussi, par la nature même de la matrice c'est à dire l'ADN proviral qui rend la technique moins sensible. Enfin, le séquençage direct ne permet de détecter que les populations virales majoritaires alors que de nombreuses sous-populations minoritaires circulent chez un même individu.

Les résultats obtenus au cours de cette mise au point sont les suivants :

- Sur 72 gènes au total, 71 ont été amplifiés par PCR après 2 améliorations successives du protocole.
- Sur 71 gènes amplifiés, 65 ont été complètement séquencés.
- Sur 90 résultats disponibles par laboratoire (un résultat d'interprétation pour chaque classe thérapeutique et pour le génotropisme sur chaque échantillon), 73 ont pu être comparés entre les deux centres.
- Parmi ces 73 résultats comparables, nous avons 53 interprétations identiques entre les deux laboratoires.

- Parmi les 20 différences d'interprétation, 11 ont un éventuel impact sur le choix ultérieur de la stratégie thérapeutique. On considère que pour les autres différences, l'impact clinique est minime à nul. En effet, il s'agit principalement de molécules qui ne sont plus ou quasiment plus utilisées ou pour lesquelles le profil de résistance est seulement décrit comme « possible ».

Nous envisageons d'implanter cette technique au laboratoire de virologie du CHU d'Angers suite à cette mise au point. Il sera néanmoins nécessaire de valider ce protocole sur l'ARN car l'objectif du laboratoire est de disposer d'un protocole unique pour la réalisation des génotypages de résistance quelle que soit la matrice : ADN proviral ou ARN génomique du VIH-1. Suite à nos résultats, une piste d'amélioration est aussi envisagée sur la qualification initiale de l'échantillon qui consiste à quantifier l'ADN cellulaire du VIH-1.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la mise en place d'un traitement ARV efficace aboutit généralement à une charge virale plasmatique indétectable. Cependant, le virus persiste dans certaines lignées cellulaires spécifiques et provoque un rebond virologique en cas d'interruption de traitement. Ces cellules infectées de manière latente constituent le réservoir de l'infection et le principal obstacle à son éradication.

Dans les cellules, l'ADN du VIH peut exister sous différentes formes. D'abord, sous forme d'ADN intégré au génome de la cellule hôte. Mais aussi, sous diverses formes d'ADN non intégré incluant le complexe de pré-intégration et deux principales formes circulantes 1-LTR et 2-LTR. L'ADN proviral reste la forme la plus stable et persiste indéfiniment dans les cellules infectées. La méthode la plus commune pour la quantification de l'ADN VIH cellulaire est la technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR). Elle combine la PCR et l'analyse des produits amplifiés et nécessite donc une seule étape. Comparée aux autres techniques de PCR usuelles, elle est plus sensible et plus spécifique. Par contre, cette méthode ne peut pas distinguer les formes virales capables de se répliquer ou non. Dans les années à venir, de nouvelles techniques vont se développer. Notamment, la PCR « numérique » qui se révèle être une méthode plus précise que la qPCR. [103]

Nous avons constaté dans nos résultats que pour certains échantillons, le séquençage de l'ADN proviral était incomplet ou impossible et cela, peut-être à cause d'une quantité d'ADN insuffisante dans l'échantillon. C'est pourquoi, connaître la quantité d'ADN VIH cellulaire présente chez un sujet infecté avant la réalisation du génotypage de résistance à partir de l'ADN proviral, pourrait permettre de « prédire » davantage la réussite de ce test.

PARTIE 5. LA PLACE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS LA PRISE EN CHARGE DU VIH

Le pharmacien d'officine est peu concerné par les techniques de biologie moléculaire des laboratoires de virologie qui évaluent les résistances aux traitements antirétroviraux. Mais, il a néanmoins sa place dans le suivi et l'accompagnement des PVVIH.

La bonne observance des traitements permet de contrôler la charge virale. Or, dans les cas d'échecs virologique, l'émergence des résistances est favorisée. Le pharmacien qui délivre le traitement mensuellement, occupe une place privilégiée pour évaluer l'observance.

Le développement des nouvelles thérapies a considérablement augmenté l'espérance de vie des patients. En revanche, ces traitements s'accompagnent de nombreux effets indésirables et interactions médicamenteuses. C'est là que le pharmacien d'officine intervient pour orienter et conseiller les patients dans la gestion de leur traitement.

I. Rôle du pharmacien d'officine dans la prévention

Le pharmacien a un rôle important dans la prévention de la transmission du VIH. Il doit insister sur les mesures de prévention et veiller à adopter à tout moment une attitude professionnelle et neutre, sans émettre de jugement.

I.1. Les outils de la prévention

Le pharmacien d'officine doit faire la promotion de l'utilisation du préservatif qui reste le seul moyen efficace de protection contre les maladies sexuellement transmissibles.

Chez les usagers de drogues injectables, il doit proposer l'utilisation de matériel stérile en délivrant les kits d'injection Stéribox®.

I.2. Le dépistage

La prévention passe également par les nouveaux dispositifs de dépistage. Même si le pharmacien d'officine n'est pas habilité à réaliser des actes de biologie médicale, il doit informer les patients sur l'existence des Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD).

Les TROD, sont définis comme « des tests unitaires, à lecture subjective, de réalisation simple et conçu pour donner un résultat dans un délai court, généralement inférieur à trente minutes, contrairement à la méthode ELISA. Ils peuvent être réalisés sur sang total, salive, sérum ou plasma et permettent la détection des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 ». [51] Un résultat négatif ne peut être interprété en cas de prise de risque datant de moins de trois mois.

Ces tests sont principalement utilisés dans les situations citées ci-dessous :

- « Dans les pays en voie de développement qui ne recourent pas ou insuffisamment au dispositif classique de dépistage.
- En France, dans les situations d'urgence (AES, accident d'exposition sexuelle, accouchement, pathologie évocatrice du stade sida).
- En cas d'impossibilité de réaliser un diagnostic biologique par la méthode ELISA. » [49]

Bien que ces tests soient performants pour dépister les anticorps au cours de la phase chronique de l'infection, ils ne sont pas aussi sensibles que les tests ELISA combinés au cours de la primo-infection. C'est pourquoi, dans tous les cas, le TROD positif devra être validé par un test ELISA combiné quel que soit son résultat.

Néanmoins, ils présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'appareillage coûteux ni d'entretien particulier. Ils sont utilisables sur le terrain, en dehors du laboratoire et permettent de cibler des populations qui ignorent l'existence des structures classiques de dépistage, ne souhaitent pas ou ne peuvent pas y avoir recours. [104]

Depuis septembre 2015, des autotests de dépistage du VIH sont disponibles en officine en France. Il s'agit également de tests de dépistage à résultat rapide (TROD de 3^{ème} génération). Cependant, le prélèvement, la lecture et l'interprétation du test sont réalisés directement par le patient lui-même et non par une tierce personne. Ils ne nécessitent pas de matériels spécifiques supplémentaires à ceux proposés dans le kit. Ils sont réalisables soit sur sang total par prélèvement d'une goutte au bout du doigt, soit sur le fluide gingival. Ils reposent sur la technique de l'immunochromatographie et permettent la détection des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Comme pour les TROD décrits précédemment, tout résultat positif doit être confirmé par une technique de laboratoire standardisée ELISA. Le résultat est fiable si le délai écoulé depuis la dernière prise de risque est de trois mois ou plus. [51] [54]

II. Rôle du pharmacien d'officine lors de la délivrance

L'infection par le VIH, fait partie de la liste des trente affections longue durée dites « exonérantes ». Il s'agit « d'affections dont la gravité et/ou le caractère chronique nécessitent un traitement prolongé et une thérapeutique particulièrement coûteuse ». A ce titre, le ticket modérateur est supprimé et les patients bénéficient d'une prise en charge à 100% par la sécurité sociale, des traitements qui y sont relatifs. [105]

II.1. Détecter les interactions médicamenteuses

Une des premières étapes de la délivrance, consiste en une analyse pharmaceutique de l'ordonnance.

Avec les antirétroviraux, de nombreuses interactions peuvent survenir. D'une part, lorsque les antirétroviraux sont associés, mais aussi lorsqu'ils sont administrés avec d'autres médicaments destinés à traiter des pathologies opportunistes ou associées.

Par exemple, certaines associations entre INTI ne sont pas recommandées et ne sont plus utilisées en raison du risque d'augmentation de leur toxicité.

Les inducteurs enzymatiques des cytochromes P450 entraînent une diminution de l'exposition au médicament et conduisent à sa perte d'activité et d'efficacité. Par conséquent, ils ne doivent pas être associés aux traitements antirétroviraux. Quelques exemples de ces molécules inductrices sont : la rifampicine, la carbamazépine, la phénytoïne, le millepertuis.

A l'inverse, les inhibiteurs enzymatiques entraînent une augmentation des concentrations plasmatiques des ARV et majorent leur risque de toxicité. Il s'agit par exemple, des antifongiques azolés, des macrolides, du jus de pamplemousse.

Parmi les ARV, certains ont aussi ce pouvoir inducteur ou inhibiteur. Les INNTI sont des inducteurs enzymatiques. Leur utilisation, peut diminuer l'efficacité de la contraception orale. Le pharmacien devra alors prévenir la patiente pour envisager une autre méthode de contraception ou utiliser une contraception mécanique supplémentaire.

Les IP associés au ritonavir, sont eux, de puissants inhibiteurs enzymatiques. La vigilance du pharmacien doit être maximale lors de leur prescription avec des médicaments à marge thérapeutique étroite puisque le risque de toxicité est important. Par exemple, les IP sont contre-indiqués avec les statines compte tenu du risque augmenté de rhabdomyolyse.

Aujourd'hui dans les officines, la création et l'utilisation du dossier pharmaceutique qui regroupe l'ensemble des délivrances d'un patient est un outil indispensable pour sécuriser la dispensation et faciliter la détection des interactions par le pharmacien. [106]

II.2. Gérer les effets indésirables et donner des conseils associés

Au moment de la première délivrance du traitement, le pharmacien doit prévenir le patient des effets indésirables possibles et apporter des conseils adaptés pour les limiter. Puis, à l'occasion de chaque renouvellement, il peut évaluer la tolérance des médicaments en interrogeant le patient. A partir de là, il doit juger la gravité de ses effets et si besoin, orienter la personne vers son médecin prescripteur.

- *Les troubles digestifs*

Un ensemble de conseils simples et faciles à mettre en place peuvent limiter les troubles digestifs liés aux traitements. Selon les molécules, la prise du traitement au milieu du repas permettra d'améliorer la tolérance digestive.

Pour les nausées et vomissements, le pharmacien peut recommander au patient de fractionner les repas dans la journée par petites quantités, d'éviter les aliments à forte odeur et de privilégier des repas froids.

La survenue d'une diarrhée peut être limitée par l'instauration de règles hygiéno-diététiques :

- Limiter la consommation d'aliments à résidus cellulosiques importants : fruits et légumes crus, céréales
- Privilégier les repas à base de féculents (pâtes, riz blanc, semoule, pommes de terre)
- Limiter la consommation de produits laitiers non fermentés
- S'hydrater régulièrement à raison d'1,5 L par jour

Le pharmacien peut proposer au patient des traitements comme l'Imodium®, le Tiorfan® ou encore le Smecta® en s'assurant de l'absence d'interactions avec le traitement antirétroviral et en expliquant les modalités de prise de ces médicaments.

- *Les troubles du métabolisme lipidique et glucidique*

Le rôle du pharmacien est d'encourager le patient à suivre un régime alimentaire équilibré en diminuant l'apport de graisses saturées et de sucres rapides. Pour limiter la surcharge pondérale,

il doit inciter son patient à pratiquer une activité physique régulière pour stimuler l'utilisation cellulaire du glucose.

- *Les atteintes cardiovasculaires*

En prévention du risque cardiovasculaire, l'objectif du pharmacien est d'identifier les patients les plus à risque. Les conseils du pharmacien seront les mêmes que ceux cités précédemment pour les troubles du métabolisme lipidique et glucidique.

La consommation d'alcool et de tabac, grands facteurs de risques cardiovasculaires doit aussi être prise en compte, pour encourager le sevrage. [106] [107]

- *Les troubles rénaux et hépatiques*

Concernant les risques d'atteintes rénales et hépatiques liées à l'infection par le VIH et aux ARV, le pharmacien doit insister auprès du patient sur l'importance du suivi biologique régulier.

Une adaptation posologique peut être proposée pour les ARV éliminés par voie urinaire, le plus souvent lorsque le débit de filtration glomérulaire est inférieur à 60mL/min.

Pour les patients en insuffisance rénale, le pharmacien doit être vigilant en cas de prescription de médicaments néphrotoxiques (aminosides, produits de contrastes iodés, diurétiques). Il doit informer le patient des dangers de l'automédication, notamment par rapport aux Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS).

En plus de la toxicité hépatique des ARV, près de 30% des patients infectés par le VIH sont chroniquement co-infectés par un ou des virus des hépatites, que ce soit le virus de l'hépatite C et/ou le virus de l'hépatite B. [70]

- *Les troubles neuropsychiatriques*

Les PVVIH présentent plus fréquemment des troubles psychiques que la population générale. En effet, la prévalence des troubles psychiatriques est estimée à 50% dans cette population. [108] Le pharmacien, qui rencontre régulièrement le patient pour son renouvellement peut lui proposer d'envisager un soutien psychologique. Ces troubles ne justifient pas tous d'un traitement médicamenteux. Si le pharmacien le juge nécessaire, il peut orienter le patient vers une consultation psychiatrique.

- *Le risque infectieux*

A cause de l'immunodépression provoquée par le VIH, les patients présentent une sensibilité accrue à certaines infections. Ils doivent donc bénéficier d'une protection vaccinale. Le pharmacien d'officine, acteur de santé publique, a pour mission de promouvoir la vaccination. En plus des vaccins recommandés dans le calendrier vaccinal, les vaccins contre la grippe, le pneumocoque et l'hépatite B, sont spécifiquement recommandés pour ces populations. Concernant l'hépatite A, la vaccination est recommandée chez les PVVIH essentiellement en cas de co-infection par le virus de l'hépatite C (VHC) ou le virus de l'Hépatite B (VHB), chez les HSH et toxicomanes et en cas de voyage en zone d'endémie.

La mise à jour des vaccins doit se faire le plus tôt possible au cours de la maladie, de préférence avant la mise en place du traitement.

De façon générale, les vaccins vivants atténués sont contre-indiqués ou doivent être évalués en fonction du nombre de LT-CD4⁺ chez les personnes immunodéprimées (BCG, ROR, varicelle, fièvre jaune). [109]

III. Rôle du pharmacien d'officine dans l'observance

Pour rendre la charge virale plasmatique indétectable, la bonne observance des traitements ARV est indispensable. Ces traitements, qui n'assurent aucune guérison mais améliorent la qualité de vie des personnes infectées sont relativement contraignants. Ils nécessitent chaque jour rigueur et discipline.

Le pharmacien doit savoir encourager le patient et le rassurer dans la prise de ses traitements. Chaque renouvellement lui permet de vérifier la bonne compréhension du traitement et la gestion des effets indésirables pour évaluer au mieux l'observance du patient.

III.1. Evaluer l'observance

L'assurance maladie a mis en place un questionnaire, inspiré de Morisky, pour aider les pharmaciens à évaluer l'observance thérapeutique des patients. Ce questionnaire comporte 6 questions :

- « Ce matin, avez-vous oublié de prendre votre traitement ?
- Depuis la dernière consultation, avez-vous été en panne de médicament ?

- Vous est-il arrivé de prendre votre traitement avec retard par rapport à l'heure habituelle ?
- Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre traitement parce que, certains jours, votre mémoire vous fait défaut ?
- Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre traitement parce que, certains jours, vous avez l'impression que votre traitement vous fait plus de mal que de bien ?
- Pensez-vous que vous avez trop de comprimés à prendre ? »

Le patient répond par « oui » ou « non » à chacune des questions. Il sera considéré comme bon observant s'il répond « non » à toutes les questions. En revanche, au-delà de 3 « oui », il est non observant. Dans ce cas, le pharmacien doit rechercher les causes de cette non observance et envisager avec le patient, des solutions adaptées. [110]

III.2. Favoriser l'observance

L'observance d'un malade à son traitement est le résultat de l'adéquation entre son comportement et les recommandations. Grâce à sa proximité, le pharmacien est le plus à même de comprendre, expliquer, accompagner et faciliter aux patients, la gestion quotidienne de leur traitement pour les rendre observants.

Le pharmacien peut suggérer au patient d'utiliser un pilulier. Il permettra pour chaque jour de la semaine et chaque moment de la journée de s'organiser, de limiter les oublis de prise et les éventuelles confusions entre les boîtes. Pour faciliter la préparation du pilulier, le pharmacien peut rédiger au patient un plan de prise. Le patient doit être informé qu'il peut avoir recours à une infirmière à domicile pour préparer son pilulier. Certaines pharmacies préparent des piluliers pour des maisons de retraite ou Etablissement Hébergeant des Personnes Agées Dépendantes (EHPAD).

En cas d'oubli de prise, le patient doit savoir comment agir. Le pharmacien doit insister lors de la délivrance sur la conduite à tenir. De plus, il doit convenir avec le patient de la mise en place d'un « rituel », d'une alarme ou tout autre moyen permettant d'éviter les oublis.

III.3. Eduquer le patient

La loi Hôpital Patient Santé Territoire (HPST), portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires a introduit l'Education Thérapeutique du Patient (ETP).

D'après l'article L5125-1-1-A du code de la santé publique, les pharmaciens d'officine peuvent y participer dans le cadre de leurs nouvelles missions. [111] L'ETP s'inscrit dans le parcours de soin et a pour objectif de rendre le patient plus autonome en facilitant son adhésion aux traitements et en améliorant sa qualité de vie. Il s'agit d'un processus continu, centré sur le patient. Il vise à aider le patient et ses proches à comprendre la maladie et coopérer avec les soignants. Cette prise en charge doit être pluridisciplinaire.

A l'officine, la mise en œuvre de l'éducation thérapeutique, en accord avec le patient, se déroule en plusieurs étapes.

- *Le diagnostic éducatif*

Il consiste à identifier avec le patient ses besoins et ses attentes pour formuler avec lui, des compétences à acquérir et des priorités d'apprentissage. [112]

- *La séance éducative*

Elle permet au patient d'acquérir des compétences et connaissances d'auto-soins pour répondre aux objectifs fixés lors du diagnostic éducatif. Pour cela, le pharmacien peut utiliser différents outils pédagogiques adaptés tels que des supports visuels ou auditifs, des exercices à réaliser par le patient, des jeux, pour faciliter l'apprentissage. [112]

- *L'évaluation de la séance éducative*

Après une séance éducative, le pharmacien doit évaluer les connaissances acquises par le patient, les changements qu'il a mis en œuvre dans sa vie quotidienne. Il évalue également le déroulement du programme d'ETP (évaluation par le patient et auto-évaluation du pharmacien). [112]

Actuellement, les pharmaciens d'officine sont formés à l'éducation thérapeutique dans le cadre de leurs études et suivent 40 heures de formation. L'objectif est de savoir adopter une posture éducative qui repose essentiellement sur l'écoute active et l'empathie. [113]

CONCLUSION

Pour les 37 millions de personnes dans le monde vivant avec le VIH, l'augmentation de l'accès à la thérapie antirétrovirale a considérablement fait progresser leur espérance de vie. Dans les années à venir et pour aider à mettre fin à l'épidémie du SIDA, l'objectif à atteindre est le suivant : 90% des PVVIH devront connaître leur statut sérologique, recevoir un traitement antirétroviral et obtenir une charge virale durablement supprimée.

La complexité génétique du virus et le développement de nouvelles thérapies ont conduit à l'apparition et à la sélection de variants viraux résistants présentant des mutations dans les gènes du virus codant pour les protéines cibles des traitements. Des tests génotypiques de résistance, à réaliser sur l'ARN plasmatique ont alors été recommandés par les professionnels avant toute initiation de traitement.

Au laboratoire de virologie du CHU d'Angers, nous avons réalisé la mise au point de la technique de génotypage à partir de l'ADN proviral. Bien que cette technique soit moins sensible que la technique de référence utilisant l'ARN plasmatique, elle constitue une alternative intéressante pour les patients dont la charge virale est indétectable ou lorsqu'aucun plasma n'est disponible au laboratoire. La comparaison de nos résultats à ceux de Nantes, a montré que cette technique nécessite une grande précision dans les manipulations. Il existe des variabilités inter-laboratoires concernant la qualité de la technique de séquençage de l'ADN qui peuvent conduire à des résultats d'interprétation différents ayant un impact sur la stratégie thérapeutique à adopter. Puisque nos résultats montrent une concordance sur la majorité des gènes amplifiés, l'implantation de la technique est envisagée au laboratoire d'Angers.

Cependant, il reste à valider ce protocole sur l'ARN plasmatique pour disposer d'un protocole unique adapté aux deux matrices : ADN proviral ou ARN génomique du VIH-1 performant et utilisable quelle que soit la charge virale du patient. Une autre piste d'amélioration, qui pourrait expliquer les différences d'interprétation entre les deux laboratoires est également à envisager. Elle concerne la qualité initiale de l'échantillon reçu. Il s'agirait de quantifier l'ADN cellulaire du VIH-1 avant la réalisation du test de génotypage pour améliorer l'efficacité au laboratoire.

Bien que le pharmacien d'officine ne soit pas concerné par ces techniques de biologie moléculaire, il a sa place dans le suivi et l'accompagnement des PVVIH. Certains traitements étant disponibles à l'officine, le pharmacien est un acteur indispensable pour intervenir dans le suivi du patient et la gestion de son traitement afin de faciliter l'observance. En effet, la non-observance constitue une cause majeure d'échec thérapeutique et d'apparition de résistances.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Barré-Sinoussi F, Chermann JC et al.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983, Vol 220, n°4599, pages 868-871.
2. **COREVIH Pays de la Loire.** Dossier de Presse : Journée mondiale de lutte contre le SIDA, 01 décembre 2016, [en ligne], https://www.corevih-pdl.fr/images/menu_commission/1er_decembre/DOSSIER%20DE%20PRESSE%2001-12-2016%20VF%20.pdf, consulté le 09 février 2017.
3. **ONUSIDA.** 90-90-90 : une cible ambitieuse de traitement pour aider à mettre fin à l'épidémie du sida, [en ligne], http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_fr.pdf, consulté le 31 août 2017.
4. **Institut Pasteur.** La découverte du virus du sida en 1983, [en ligne], <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/espace-presse/documents-presse/la-recherche-sur-le-vihsida-l-institut-pasteur/la-decouverte-du-virus-du-sida-en-1983>, consulté le 27 juillet 2016.
5. **King A, Adam M, Carstens E, Lefkowitz E.** Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, 2012. Chap 2, *Order of presentation of virus taxonomic descriptions*, pages 23-37.
6. **Girard PM, Katlama C, Pialoux G.** VIH. Rueil-Malmaison : Doin, 2011. Chap 1, *Virologie fondamentale de l'infection VIH*, pages 3-12.
7. **Turner B and Summers F.** Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology*, 1999, Vol 285, n°1, pages 1-32.
8. **Joshi S and Joshi RL.** Molecular biology of human immunodeficiency virus type-1. *Transfusion Science*, 1996, Vol 17, n°3, pages 351-378.
9. **Sierra S, Kupfer B, Kaiser R.** Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, 2005, Vol 34, n°4, pages 233-244.
10. **Weiss RA.** HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB life*, 2002, Vol 53, n°4-5, pages 201-205.
11. **Krogstad P.** Molecular biology of the human immunodeficiency virus : current and future targets for intervention. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2003, Vol 14, n°4, pages 258-268.
12. **Le Faou A.** Virologie humaine. Rueil-Malmaison : Pradel, 2012. Chap 20, *L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine*, pages 335-353.
13. **Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist W.** The structural biology of HIV assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, Vol 18, n°2, pages 203-217.
14. **Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013 : recommandations du groupe d'experts. Paris : DILA, 2013. Chap 13, *Diversité des VIH : conséquences pour la prise en charge*, pages 379-390.
15. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson J et al.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*, 2009, Vol 15, n°8, page 871.

16. **Peeters M et Chaix ML.** Origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine : d'où vient-il, où va-t-il ? *Virologie*, 2013, Vol 17, n°3, pages 119-131.
17. **Hemelaar J.** The origine and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, Vol 18, n°3, pages 182-192.
18. **Mourez T, Simon F, Plantier JC.** Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, Vol 26, n°3, pages 448-461.
19. **Sarafianos SG, Marchand B, Das K et al.** Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase : molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 2009, Vol 385, n°3, pages 693-713.
20. **Matamoros T, Baek K, Menéndez-Arias L.** Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 2008, Vol 375, n°5, pages 1234-1248.
21. **Béléc L.** Transmission sexuelle de l'infection par le VIH. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2007. Chap 1, *Dynamique et hétérogénéité de l'épidémie*, pages 6-40.
22. **Lacombe K et Girard PM.** Infection à VIH. *La revue du praticien*, 2003, Vol 53, n°13, pages 1479-1487.
23. **Koumavi Ekouevi D et Supervie V.** Epidémiologie de l'infection par le VIH en France et dans le monde. *La revue du praticien*, 2014, Vol 64, n°8, pages 1060-1066.
24. **ONUSD.** Rapport mondial sur les drogues 2016, [en ligne], https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WDR_2016_ExSum_french.pdf, consulté le 14 octobre 2016.
25. **Jauffret-Roustide M, Couturier E, Le Strat Y et al.** Estimation de la séroprévalence du VIH et du VHC et profils des usagers de drogues en France, étude InVS-ANRS Coquelicot, 2004. *Bulletin épidémiologie hebdomadaire*, 2006, Vol 33, pages 244-247.
26. **InVS.** Surveillance épidémiologique des donneurs de sang homologues en France entre 1992 et 2002, [en ligne], http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=5738, consulté le 19 octobre 2016.
27. **Agence de la biomédecine.** Biovigilance, [en ligne], <https://www.agence-biomedecine.fr/Biovigilance-organes>, consulté le 06 juillet 2017.
28. **Floret N, Abitebtoul D, Ayzac C et al.** Suivi des AES dans les établissements de santé. Place et intérêt des matériels de sécurité. *Feuillets de Biologie*, 2012, Vol 53, n°309, pages 1-7.
29. **InVS.** Surveillance des contaminations professionnelles par le VIH, le VHC et le VHB chez le personnel de santé, [en ligne], http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=3602, consulté le 19 octobre 2016.
30. **OMS.** Transmission du VIH de la mère à l'enfant, [en ligne], <http://www.who.int/hiv/topics/mtct/fr/>, consulté le 19 octobre 2016.
31. **Maartens G, Celum C, Lewin S.** HIV infection : epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 2014, Vol 384, n°9939, pages 258-271.
32. **Stevens J and Lyall H.** Mother to child transmission of HIV : what works and how much is enough ? *Journal of Infection*, 2014, Vol 69, pages S56-S62.

33. **Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013 : recommandations du groupe d'experts. Paris : DILA, 2013. Chap 9, *Désir d'enfant et grossesse*, pages 297-337.
34. **ONUSIDA.** Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida 2012, [en ligne], http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_fr_1.pdf, consulté le 06 juillet 2017.
35. **ONUSIDA.** Statistiques mondiales 2015, [en ligne], http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_fr.pdf, consulté le 31 octobre 2016.
36. **Global Burden Disease 2015 HIV Collaborators.** Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015 : the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet HIV, 2016, Vol 3, n°8, pages E361-E387.
37. **Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013 : recommandations du groupe d'experts. Paris : DILA, 2013. Chap 1, *Epidémiologie de l'infection par le VIH en France*, pages 25-40.
38. **Le Vu S, Barin F, Le Strat Y et al.** Estimations d'incidence de l'infection par le VIH pour les départements français d'Amérique. Réunion InVS-Association, Paris, 20 novembre 2012, [en ligne], http://www.invs.sante.fr/surveillance/vih-sida/PDF/Le_Vu_assos_20121120.pdf consulté le 31 octobre 2016.
39. **InVS.** Découvertes de séropositivité VIH et de sida, point épidémiologique 1^{er} avril 2016, [en ligne], <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infection-a-VIH-et-sida/Actualites/Decouvertes-de-seropositivite-VIH-et-de-sida.-Point-epidemiologique-du-1er-avril-2016>, consulté le 1^{er} novembre 2016.
40. **Dray-Spira R, Wilson d'Almeida K, Aubrière C et al.** Vivre avec le VIH : premiers résultats de l'enquête ANRS-Vespa2. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2013, n°26-27, pages 283-324.
41. **OMS.** Number of deaths due to VIH/AIDS estimates by WHO region, [en ligne], <http://www.who.int/gho/database/fr/>, consulté le 1^{er} novembre 2016.
42. **Roussillon C, Hénard S, Hardel L et al.** Causes de décès des patients infectés par le VIH en France en 2010. Etude ANRS EN20 Mortalité 2010. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2012, n°46-47, pages 541-545.
43. **Girard PM, Katlama C, Pialoux G.** VIH. Rueil-Malmaison : Doin, 2011. Chap 6, *Primo-infection VIH*, pages 79-84.
44. **Kahn JO and Walker BD.** Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. New England Journal of Medicine, 1998, Vol 39, n°1, pages 33-39.
45. **Février M, Dorgham K, Rebollo A.** CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection : role of apoptosis. Viruses, 2011, Vol 3, n°12, pages 586-612.
46. **Pasquet A et Yazdanpanah Y.** Infection à VIH. La revue du praticien, 2012, Vol 62, pages 255-263.
47. **Streeck H and Nixon DF.** T cell immunity in acute HIV-1 infection. The Journal of Infectious Diseases, 2010, Vol 202, n°S2, pages S302-S308.

- 48.**Derdeyn CA and Silvestri G.** Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Current Opinion in Immunology*, 2005, Vol 17, n°4, pages 366-373.
- 49.**HAS.** Dépistage de l'infection par le VIH en France : stratégies et dispositif de dépistage, [en ligne], http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/argumentaire_depistage_vih_HAS_2009-2.pdf, consulté le 31 janvier 2017.
- 50.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013 : recommandations du groupe d'experts. Paris : DILA, 2013. Chap 2, *Dépistage*, pages 41-55.
- 51.**HAS.** Autotests de dépistage du VIH : Information à l'intention des professionnels de santé et des associations, [en ligne], http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-03/argumentaire_advih_201503.pdf, consulté le 04 février 2017.
- 52.**Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B.** Evolution des réactifs de détection des anticorps anti-VIH. *Médecine et maladies infectieuses*, 1998, Vol 28, n°6-7, pages 496-504.
- 53.**Girard PM, Katlama C, Pialoux G.** VIH. Rueil-Malmaison : Doin, 2011. Chap 2, *Virologie médicale et infection VIH*, pages 13-25.
- 54.**Beylot G.** Délivrance des autotests de dépistage du VIH en officine. *Actualités Pharmaceutiques*, 2015, Vol 54, n°551, pages 1-5.
- 55.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Tableau synoptique des médicaments antirétroviraux, actualisation septembre 2016, [en ligne], http://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_tableau-synoptique.pdf, consulté le 03 mars 2017.
- 56.**De Clercq E.** Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochemical Pharmacology*, 2016, Vol 119, pages 1-7.
- 57.**Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents.** Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, [en ligne], <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>, consulté le 11 février 2017.
- 58.**University of Liverpool.** HIV Drug Interactions, [en ligne], <http://www.hiv-druginteractions.org>, consulté le 08 mars 2017.
- 59.**Yazdanpanah Y and Schwarzingher M.** Generic antiretroviral drugs and HIV care : an economic review. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2016, Vol 46, n° 2, pages 67-71.
- 60.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : optimisation d'un traitement antirétroviral en situation de succès virologique, [en ligne], http://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_optimisation.pdf, consulté le 02 mars 2017.
- 61.**Walensky RP, Sax PE, Nakamura YM et al.** Economic savings versus health losses : the cost-effectiveness of generic antiretroviral therapy in the United States. *Annals of internal medicine*, 2013, Vol 158, n°2, pages 84-92.
- 62.**Engsig FN, Gerstoft J, Helleberg M et al.** Effectiveness of antiretroviral therapy in individuals who for economic reasons were switched from a once-daily single-tablet regimen

to a triple-tablet regimen. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2014, Vol 66, n°4, pages 407-413.

63.**Stoll M, Kollan C, Bergmann F et al.** Calculation of direct antiretroviral treatment costs and potential cost savings by using generics in the German HIV ClinSurv Cohort. *Plos One*, 2011, Vol 6, n°9, pages 1-12.

64.**Llibre J, Cardona G, Santos JR et al.** Antiretroviral treatment switch strategies for lowering the costs of antiretroviral therapy in subjects with suppressed HIV-1 viremia in Spain. *ClinicoEconomics and Outcomes Research*, 2013, Vol 5, pages 215-221.

65.**Despiéglé N, Anger D, Martin M et al.** Cost-effectiveness of dolutegravir in HIV-1 treatment-naïve and treatment-experienced patients in Canada. *Infectious Diseases and Therapy*, Vol 4, n°3, pages 337-353.

66.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : Initiation d'un premier traitement antirétroviral, actualisation novembre 2016, [en ligne], http://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_initiation.pdf, consulté le 02 mars 2017.

67.**WHO.** Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV september 2015, [en ligne], http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186275/1/9789241509565_eng.pdf?ua=1, consulté le 09 février 2017.

68.**Günthard HF, Saag MS, Benson CA et al.** Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults : 2016 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *Jama*, 2016, Vol 316, n°2, pages 191-210.

69.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : prise en charge des situations d'échec virologique, actualisation novembre 2016, [en ligne], http://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_echec.pdf, consulté le 02 mars 2017.

70.**Ministère des affaires sociales et de la santé et Morlat P.** Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013 : recommandations du groupe d'experts. Paris : DILA, 2013. Chap 5, *Suivi de l'adulte vivant avec le VIH, prévention et prise en charge des comorbidités*, pages 115-172.

71.**Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW.** HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, Vol 46, pages 292-307.

72.**Girard PM, Katlama C, Pialoux G.** VIH. Rueil-Malmaison : Doin, 2011. Chap 33, *Résistance aux antirétroviraux*, pages 461-485.

73.**Delaugerre C.** Barrière génétique à la résistance des antirétroviraux : le point sur le raltégravir, premier inhibiteur d'intégrase. *Médecine et maladies infectieuses*, 2010, Vol 40, pages S1-S10.

74.**Bigaillon C, Mérens A, Rapp C.** Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010, n°422, pages 69-82.

75.**Stanford University.** HIV drug resistance database, [en ligne], <https://hivdb.stanford.edu/>, consulté le 20 juillet 2017.

76. **Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM et al.** Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection : 2008 recommendations of an international AIDS Society–USA Panel. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, Vol 47, n°2, pages 266-285.
77. **Wirten M, Soulie C, Valantin MA.** Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, Vol66, n°4, pages 709-712.
78. **Ameziane N, Bogard M, Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier, 2005. Chap 9, *Extraction-purification de l'ADN et de l'ARN*, pages 215-228.
79. **Biomérieux.** NucliSENS easyMAG®, [en ligne], <http://www.biomerieux.co.uk/product/nuclisensr-easymag>, consulté le 16 septembre 2016.
80. **Ameziane N, Bogard M, Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier, 2005. Chap 10, *Polymerase chain reaction et autres systèmes d'amplification*, pages 229-307.
81. **TaKaRa Bio Inc.** Premix Ex Taq DNA Polymerase Hot Start Version (RR030A), [en ligne], http://www.clontech.com/xxclt_searchResults.jsp, consulté le 15 septembre 2016.
82. **ANRS AC11 Resistance Study Group.** PCR and Sequencing Procedures : HIV-1 Version January 2015, [en ligne], <http://www.hivfrenchresistance.org/index.html>, consulté le 16 septembre 2016.
83. **Ameziane N, Bogard M, Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier, 2005. Chap 6, *Séparation des acides nucléiques*, pages 155-171.
84. **Macherey-Nagel.** PCR clean-up : User manual NucleoFast ® 96 PCR, [en ligne], http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_NFast96.pdf, consulté le 5 janvier 2017.
85. **PerkinElmer.** MultiPROBE ® II Application Note, [en ligne], http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/ApplicationNotes/AN_NS96TissPlantHC_PE_MultiProbeIIHTEX.pdf, consulté le 5 janvier 2017.
86. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1977, Vol 74, n°12, pages 5463-5467.
87. **Ameziane N, Bogard M, Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier, 2005. Chap 16, *Techniques de séquençage de l'ADN*, pages 403-416.
88. **ANRS.** HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms, [en ligne], <http://www.hivfrenchresistance.org/2016/Algo2016-hiv1.pdf>, consulté le 20 juillet 2017.
89. **Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC et al.** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. Immuno-analyse et biologie spécialisée, 2008, Vol 23, n°5, pages 260-279.
90. **Hunt GM, Morris L, Moorthy A et al.** Concordance between allele-specific PCR and ultra-deep pyrosequencing for the detection of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *Journal of Virological Methods*, 2014, Vol 207, pages 182-187.

91. **Stelzl E, Pröll J, Bizon B *et al.*** Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: evaluation of a new ultra-deep sequencing-based protocol and comparison with the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit. *Journal of Virological Methods*, 2011, Vol 178, n°1-2, pages 94-97.
92. **Gall A, Ferns B, Morris C *et al.*** Universal amplification, next-generation sequencing, and assembly of HIV-1 genomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, Vol 50, n°12, pages 3838-3844.
93. **Novitsky V, Zahralban-Steele M, McLane MF *et al.*** Long-range HIV genotyping using viral RNA and proviral DNA for analysis of HIV drug resistance and HIV clustering. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, Vol 53, n°8, pages 2581-2592.
94. **Delaugerre C, Braun J, Charreau I *et al.*** Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication: Drug resistance in HIV-1 DNA and RNA. *HIV Medicine*, 2012, Vol 13, n°9, pages 517-525.
95. **Zaccarelli M, Santoro M, Armenia D *et al.*** Genotypic resistance test in proviral DNA can identify resistance mutations never detected in historical genotypic test in patients with low level or undetectable HIV-RNA. *Journal of Clinical Virology*, 2016, Vol 82, pages 94-100.
96. **Gantner P, Morand-Joubert L, Sueur C *et al.*** Drug resistance and tropism as markers of the dynamics of HIV-1 DNA quasispecies in blood cells of heavily pretreated patients who achieved sustained virological suppression. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, Vol 71, n°3, pages 751-761.
97. **Wensing AM, Calvez V, Günthard HF *et al.*** 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Resistance Mutations Update, 2016-2017*, Vol 24, n°4, pages 132.-141.
98. **Appadurai R and Senapati S.** How mutations can resist drug binding yet keep HIV-1 protease functional. *Biochemistry*, 2017, Vol 56, n° 23, pages 2907-2920.
99. **Han YS, Mesplède T, Wainberg MA.** Differences among HIV-1 subtypes in drug resistance against integrase inhibitors. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, Vol 46, pages 286-291.
100. **Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J *et al.*** TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, Vol 54, n°2, pages 718-727.
101. **Vandekerckhove LPR and Wensing AM.** European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *The Lancet infectious diseases*, 2011, Vol 11, n°5, pages 394-407.
102. **Mir D and Jung M.** Phylodynamics of the major HIV-1 CRF02_AG african lineages and its global dissemination. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, Vol 46, pages 190-199.
103. **Alidjinou EK, Bocket L, Hober D.** Quantification of viral DNA during HIV-1 infection : a review of relevant clinical uses and laboratory methods. *Pathologie Biologie*, 2015, Vol 63, n°1, pages 53-59.
104. **Gautheret-Dejean A.** Actualités sur les tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à VIH : législation, performances, avantages et inconvénients. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2013, Vol 28, n°1, pages 8-17.

- 105.**Assurance Maladie**. Qu'est-ce qu'une affection de longue durée ?, [en ligne], <http://www.ameli.fr/professionnels-de-sante/medecins/exercer-au-quotidien/les-affections-de-longue-duree/qu-est-ce-qu-une-affection-de-longue-duree/les-ald-exonerantes.php>, consulté le 06 avril 2017.
- 106.**Gerbouin O et Grellet J**. Les antirétroviraux anti-VIH disponibles. Actualités Pharmaceutiques, 2017, Vol 56, n°564, pages 3-16.
- 107.**Gerbouin O et Grellet J**. Stratégie thérapeutique dans l'infection à virus de l'immunodéficience humaine. Actualités Pharmaceutiques, 2017, Vol 56, n°564, pages 17-19.
- 108.**Jallow A, Ljunggren G, Wändell P et al**. HIV-infection and psychiatric illnesses – A double edged sword that threatens the vision of a contained epidemic. Journal of Infection, 2017, Vol 74, n°1, pages 22-28.
- 109.**HCSP**. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques : recommandations, 2^{ème} édition-décembre 2014, [en ligne], <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504>, consulté le 13 avril 2017.
- 110.**Assurance Maladie**. Evaluation de l'observance d'un traitement médicamenteux, [en ligne], http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/Respect-traitement-2007.pdf, consulté le 13 avril 2017.
- 111.**Légifrance**. Code de la santé publique, article L5125-1-1 A, [en ligne], https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=875F9EA3350DDF5B869FC712E2E007E7.tpdila20v_2?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000020890192&dateTexte=20170420&categorieLien=id#LEGIARTI000020890192, consulté le 20 avril 2017.
- 112.**HAS**. Education thérapeutique du patient : comment la proposer et la réaliser ?, [en ligne], https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/etp_-_comment_la_proposer_et_la_realiser_-_recommandations_juin_2007.pdf, consulté le 20 avril 2017.
- 113.**Allenet B**. Pour que l'éducation thérapeutique du patient devienne pour le pharmacien une posture de travail. Annales Pharmaceutiques Françaises, 2012, Vol 70, n°1, pages 53-57.

ANNEXES

ANNEXE 1 - Liste d'abréviation des acides aminés

A = Alanine

C = Cystéine

D = Acide aspartique

E = Acide glutamique

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 = Tryptophane


Y = Tyrosine

ANNEXE 2 - Mutations majeures de résistance aux antirétroviraux [75]

Major HIV-1 Drug Resistance Mutations

Updated Feb 6, 2017

Updated summary from the HIV Drug Resistance Database. This document can be downloaded from the hivdb.stanford.edu home page.



Stanford
HIVDB

Major Nucleoside RT Inhibitor (NRTI) Resistance Mutations

	Non-TAMs					TAMs					MDR		
	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
Cons	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T	Q
3TC	VI	R										Ins	M
FTC	VI	R										Ins	M
ABC	VI	R	E	VI	F	L			W	FY		INS	M
TDF	***	R	E		F	L		R	W	FY		INS	M
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	FY	QE	INS	M

Bold underline: High-level reduced susceptibility or virological response.
Bold: Reduced susceptibility or virological response.
Plain text: Reduced susceptibility in combination with other NRTI-resistance mutations.
Asterisk: Increased susceptibility.
TAMs: Thymidine analog mutations. Selected by AZT and d4T and facilitate primer unblocking. Non-TAMs prevent NRTI incorporation.
MDR: Multidrug resistance mutations. T69 insertions occur with TAMs. Q151M occurs with non-TAMs and the accessory mutations A62V, V75I, F77L, and F116Y.
M184VI: The most common NRTI-resistance mutations. Although they cause high-level in vitro resistance to 3TC/FTC, they are not contraindications to 3TC/FTC because they increase TDF and AZT susceptibility and decrease viral replication fitness.
Additional mutations: K65N similar but weaker than K65R. K70GQNT similar to K70E. T69D and V75MT reduce susceptibility to d4T and ddI, which are not shown because they are no longer recommended for HIV treatment. T215SCDEIV (T215 revertants) emerge from T215YF in the absence of NRTIs. E40F, E44DA, D67GE, V118I, and K219NR are accessory TAMs. T69 deletions occur in combination with K65R and/or Q151M.
References: hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NRTI/

Major Non-Nucleoside RT Inhibitor (NNRTI) Resistance Mutations

	100	101	103	106	181	188	190	230
Cons	L	K	K	V	Y	Y	G	M
NVP	I	EP	NS	AM	CIV	LCH	ASEQ	L
EFV	I	EP	NS	AM	CIV	LCH	ASEQ	L
ETR	I	EP			CIV	L	ASEQ	L
RPV	I	EP			CIV	L	ASEQ	L

Bold underline: High-level reduced susceptibility or virological response.
Bold: Reduced susceptibility or virological response.
Plain text: Reduced susceptibility in combination with other NNRTI-resistance mutations.
Abbreviations: nevirapine (NVP), efavirenz (EFV), etravirine (ETR), rilpivirine (RPV).
Synergistic combinations: V179D+K103R reduce NVP and EFV susceptibility >10-fold. Y181C+V179F cause high-level ETR and RPV resistance.
ETR genotypic susceptibility score (DRV package insert): Y181IV (3.0); L100I, K101P, Y181C, M230L (2.5); V90I, E138A, V179F, G190S (1.5); A98G, K101EH, V106I, V179DT, G190A (1.0); <2.5 susceptible; 2.5 to 3.0 intermediate; >3.0 high-level. V90I, A98G, V106I, E138A, V179DT, G190A/S have little effect on ETR susceptibility unless they occur with a bolded mutations.
E138 mutations: E138GQK are nonpolymorphic mutations associated with intermediate/high-level RPV resistance. E138A is a polymorphic mutation associated with low-level RPV resistance.
Additional accessory mutations: V90I (ETR), A98G (NVP, EFV, ETR, RPV), V108I, V179T (ETR), V179L (RPV), P225H (EFV), K238T (NVP, EFV), L318F.
References: hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/

STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE

Major HIV-1 Drug Resistance Mutations

hivdb.stanford.edu

Major Integrase Inhibitor (INI) Resistance Mutations										
	66	92	138	140	143	147	148	155	263	
Cons	T	E	E	G	Y	S	Q	N	R	
RAL	AIK	Q	KAT	SAC	RCH		HRK	H	K	
EVG	AIK	Q	KAT	SAC		G	HRK	H	K	
DTG	K	Q	KAT	SAC			HRK	H	K	

Bold underline: High-level reduced susceptibility or virological response.

Bold: Low-level reduced susceptibility or reduced susceptibility or virological response.

Plain text: Reduced susceptibility in combination with other INI-resistance mutations.

Abbreviations: Dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG), raltegravir (RAL).

Additional mutations: H51Y, L74M, T97A, S153YF, Q1SC, G163RK, and S230R are relatively nonpolymorphic RAL and/or EVG-selected accessory resistance mutations. E92GV, G118R, F121Y, Y143KSGA, P145S, Q146P, and N155ST are rare nonpolymorphic IN mutations that reduce RAL and/or EVG susceptibility.

References: hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/

Major Protease Inhibitor (PI) Resistance Mutations													
	24	32	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90	
Cons	D	V	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L	
ATV/r		I	IL	V	VM	L	VTALM		ATFS	V	S	M	
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V			
LPV/r	I	I	IL	VA	VM	V	VTALM	V	AFTS	V		M	

Bold underline: High-level reduced susceptibility or virological response.

Bold: Reduced susceptibility or virological response.

Plain text: Reduced susceptibility in combination with other PI-resistance mutations.

Abbreviations: atazanavir (ATV), darunavir (DRV), lopinavir (LPV), 'r' (ritonavir).

Additional mutations: L10F, V11I, K20TV, L23I, K43T, F53L, Q58E, A71IL, G73STCA, T74P, N83D, and L89V are common nonpolymorphic accessory mutations. L10RY, V11L, L24F, M46V, G48ASTLQ, F53Y, I54S, V82CM, I84AC, N88TG are rare nonpolymorphic variants.

Hypersusceptibility: I50L (each PI except ATV); L76V (ATV).

References: hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/PI/

HIV-1 RT and Protease Mutations for Drug-Resistance Surveillance*					
NRTIs		NNRTIs		PIs	
M41	L	L100	I	L23	I
K65	R	K101	E,P	L24	I
D67	N,G,E	K103	N,S	D30	N
T69	D,Ins	V106	M,A	V32	I
K70	R,E	V179	F	M46	I,L
L74	V,I	Y181	C,I,V	I47	V,A
V75	M,T,A,S	Y188	L,H,C	G48	V,M
F77	L	G190	A,S,E	I50	V,L
Y115	F	P225	H	F53	F,Y
F116	Y	M230	L	I54	V,L,M,A,T,S
Q151	M			G73	S,T,C,A
M184	V,I			L76	V
L210	W			V82	A,T,F,S,C,M,L
T215	Y,F,I,S,C,D,V,E			N83	D
K219	Q,E,N,R			I84	V,A,C
				I85	V
				N88	D,S
				L90	M

*Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance: 2009 Update, PLoS One 2009;4:e4724.

Reference: hivdb.stanford.edu/page/who-resistance-list/

ANNEXE 3 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INTI [88]

September 2016- Version n°26

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	<ul style="list-style-type: none"> T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] Q151M Insertion at codon 69 	
3TC/FTC	<ul style="list-style-type: none"> K65R [11, 12, 16] M184V/I Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> Q151M
ddl	<ul style="list-style-type: none"> At least a score of + 2 among: M41L + T69D + 215Y/F + K219Q/E – K70R – M184 V/I [5, 14, 15, 17, 18] K65R [11, 12] L74V/I [19] Q151M Insertion at codon 69 	
d4T	<ul style="list-style-type: none"> V75A/M/S/T T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [6] At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [4, 7, 14, 15] K65R [30, 31, 32] Q151M Insertion at codon 69 	
ABC	<ul style="list-style-type: none"> At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] K65R [9, 11, 12] L74V/I [24, 25, 26, 27, 28, 29] Y115F Q151M Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] M184V/I [36]
TDF/TAF	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 20, 33, 37, 38] K65R/E/N [9, 10, 11, 12, 34, 35, 37, 38] Insertion at codon 69 K70E [21, 22, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 33, 37, 38]

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

ANNEXE 4 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INNTI [88]

September 2016- Version n°26

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
EFV	<ul style="list-style-type: none"> • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106M [2] • E138K [12, 13] • Y181C/I • Y188C/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • P225H • M230L 	
NVP	<ul style="list-style-type: none"> • A98S (for HIV-1 subtype C only) [3] • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106A/M [2] • Y181C/I • Y188C/H/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • M230L 	<ul style="list-style-type: none"> • E138K [13]
ETR	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138K [12, 13] • Y181C/I/V [5, 6] • H221Y [12,16] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138A/G/Q/R/S [5, 6, 7, 8]
RPV	<ul style="list-style-type: none"> • K101E/P [9, 13] • E138A/G/K/Q/R/S [12, 13, 14] • V179L [9] • Y181C/I/V [13] • Y188L [9] • H221Y [13] • M230I/L/V [9] • L100I + K103N/S [9, 15] • L100I + K103R + V179D [15] 	<ul style="list-style-type: none"> • V179D [9,15, 17]

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

ANNEXE 5 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux IP [88]

September 2016- Version n°26

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: PROTEASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
IDV	<ul style="list-style-type: none"> • M46I/L • V82A/F/M/S/T [11] • I84A/V [8] • L90M and at least 2 among: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I 	<ul style="list-style-type: none"> • L90M
SQV/RTV 1000/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • G48V • At least 3 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9]
NFV	<ul style="list-style-type: none"> • D30N • I84A/V [8] • N88S/D • L90M 	<ul style="list-style-type: none"> • V82A/F/S/T and at least 2 among: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I [1]
LPV/r	<ul style="list-style-type: none"> • At least 4 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21] • I47A [15, 16] • L76V [18, 19] 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21]
FPV/RTV 700/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • I50V • V32I and I47A/V [2, 13, 14] • At least 4 mutations among: L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M [2, 20] 	
ATV/RTV 300/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> • I50L [6] • N88S [28,29,30] • At least 3 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31]
TPV/RTV 500/200 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • At least a score of + 3*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> • A score of + 2*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23]

September 2016- Version n°26

DRV/RTV** 600/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27]
800/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27] 	

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

* Insufficient data for HIV-1 subtype non-B

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

ANNEXE 6 - Algorithme d'interprétation des mutations de résistance aux INI [88]

September 2016- Version n°26

ANRS - AC 11 : RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
RAL	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [10] • E92Q [1, 2] • G118R [10, 17] • F121Y [10,17] • G140A/S [7] • Y143A/C/G/H/R/S [1, 3, 4, 5, 8, 14] • Q148E/G/H/K/R [1, 2] • V151L [9] • N155H/S/T [1, 2, 9] • E157Q [2] • A49G + S230G/R + R263K [18] 	
EVG	<ul style="list-style-type: none"> • T66I/A/K [6] • E92Q [6] • T97A [21,22] • G118R [17] • F121Y [9,17] • E138K • G140C/S • Y143A/C/G/H/R/S [14] • P145S [9] • S147G [21] • Q148H/R/K [6] • V151L [9] • N155H/S/T [6,9] • E157Q [11] • R263K [18] 	

DTG*	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12,13] • F121Y [17] • V151L [9] • S153Y [9] • R263K [16] • T66K + L74M [9] • E92Q + N155H [9, 23, 24] • Q148H/K/R + at least 2 mutations among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15] • Q148R + N155H [9] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • S153F [9] • E157Q [19, 20] • Q148H/K/R + 1 mutation among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15]
50 mg BID		
50 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12,13] • F121Y [17] • E138A/K/T • G140A/C/S • Q148H/K/R • V151L [9] • S153Y [9] • N155H [18] • R263K [16] • T66K + L74M [9] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • S153F [9] • E157Q [19, 20]
CBG	<ul style="list-style-type: none"> • Q148K/R [25, 26, 27] 	

RAL: raltegravir, EVG: elvitegravir, DTG: dolutegravir, CBG: cabotegravir

* Please note that rules are different for DTG 50 mg BID and 50 mg QD

ANNEXE 7 - Mutations de résistance aux INTI identifiées à Angers et à Nantes (**Aucune résistance** ; **Résistance possible** ; **Résistance** ; = Mutations communes ; SI = séquençage incomplet ; SS = Echec du Séquençage ; NR = Non réalise ; AA = Absence d'amplification)

Echantillons	Laboratoire	Mutations identifiées impliquées dans la résistance aux INTI										Résistances
		M41	D67	T69	K70	L74	Y115	M184	L210	T215	K219	
E1	Angers											SI
	Nantes											Aucune
E2	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E3	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E4	Angers		N/D					I/M	W/L	N/T		ZDV-3TC/FTC-d4T-ABC-TDF
	Nantes											Aucune
E5	Angers		N	D	R					V	Q	ZDV-d4T-ABC-TDF
	Nantes	M/L	N	D	R			V/M		V/F	Q	Tous les INRT
E6	Angers	L				I/L		V/M	W/L	Y		ZDV-3TC/FTC-ddI-d4T-ABC-TDF
	Nantes											Aucune
E7	Angers			N								Aucune
	Nantes			N/T								Aucune
E8	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E9	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E10	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E11	Angers											Aucune
	Nantes		N/D		R/K							Aucune
E12	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E13	Angers											SI
	Nantes											Aucune
E14	Angers					I	F	V		I	E	ZDV-3TC/FTC-d4T-ABC-ddI
	Nantes							V				3TC/FTC
E15	Angers											Aucune
	Nantes		N/D		R/K			V/M		N/T/I/Y/S/F	E/Q/K	ABC-3TC/FTC-d4T-ZDV
E16	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune
E17	Angers											SI
	Nantes											Aucune
E18	Angers											Aucune
	Nantes											Aucune

ANNEXE 8 - Mutations de résistance aux INNTI identifiées à Angers et à Nantes

Echantillons	Laboratoire	Mutations identifiées impliquées dans la résistance aux INNTI								Résistances
		V90	K101	K103	V179	Y181	G190	H221	M230	
E1	Angers									SI
	Nantes									Aucune
E2	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E3	Angers				I					Aucune
	Nantes				I					Aucune
E4	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E5	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E6	Angers				I/V			Y/R/C/H		ETR-RPV
	Nantes									Aucune
E7	Angers		R							Aucune
	Nantes		R/K							Aucune
E8	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E9	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E10	Angers								V	RPV
	Nantes								M/I	RPV
E11	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E12	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E13	Angers									SI
	Nantes									Aucune
E14	Angers	I	R			C	A			EFV-NVP-ETR-RPV
	Nantes	I								Aucune
E15	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E16	Angers									Aucune
	Nantes									Aucune
E17	Angers									SI
	Nantes									Aucune
E18	Angers			N/K	I					EFV-NVP
	Nantes				I					Aucune

ANNEXE 9 - Mutations de résistance aux IP identifiées à Angers et à Nantes

Echantillons	Laboratoire	Mutations identifiées impliquées dans la résistance aux IP																				Résistances	
		L10	I15	G16	K20	D30	V32	M36	M46	I47	I54	I62	L63	H69	A71	G73	V77	V82	I84	N88	L89		L90
E1	Angers																						Aucune
	Nantes					N/D																	NFV
E2	Angers													K									SI
	Nantes			E	I			I															Aucune
E3	Angers	I/L		E	I			I						K							M		SQV/r-ATV/r
	Nantes	I/L		E	I			I						K							M		SQV/r- ATV/r
E4	Angers							I					P										Aucune
	Nantes		V					I					P										Aucune
E5	Angers		V	A									S				I						Aucune
	Nantes	V/L	V/I	E/A									F/S/L/P				V/I						ATV/r
E6	Angers	I										V	P			S							SQV/r
	Nantes	L/I/F							M/L		V/I	V	P		V/A/I/T	G/S		V/A/I/T	V/I			M/L	IDV-SQV/r-NFV FPV/r-LPV/r- ATV/r
E7	Angers							I				V		K				I			M		Aucune
	Nantes					N/D		I				V		K				I			M		NFV
E8	Angers																I						Aucune
	Nantes											I/V				S/G	I						SQV/r
E9	Angers							I/M				V	P										Aucune
	Nantes											V	P			G/S							SQV/r

Echantillons	Laboratoire	Mutations identifiées impliquées dans la résistance aux IP																				Résistances	
		L10	I15	G16	K20	D30	V32	M36	M46	I47	I54	I62	L63	H69	A71	G73	V77	V82	I84	N88	L89		L90
E10	Angers																I						Aucune
	Nantes																I						Aucune
E11	Angers							I								S	I						Aucune
	Nantes																I						Aucune
E12	Angers	V	V									P											SQV/r
	Nantes	V	V					I				P				G/S							SQV/r
E13	Angers										V/I						I/V						Aucune
	Nantes										V				A/T								Aucune
E14	Angers	F					I		I	V		P								S	I		IDV-NFV-FPV/r- DRV/rQD- LPV/r- ATV/r
	Nantes																						AA
E15	Angers											V	P	N									Aucune
	Nantes	I							I/M			V	P			G/S	V/I					M/I/L	IDV-SQV/r-NFV- FPV/r-LPV/r-ATV/r
E16	Angers				I			I						K			I	I			M		Aucune
	Nantes				I			I						K			I	I			M		Aucune
E17	Angers	I	V		I	N		I	I				P								M		IDV-SQV/r-NFV- LPV/r-ATV/r
	Nantes	I	V		I			I					P								M		SQV/r
E18	Angers	I			I			I						K							M		SQV/r
	Nantes	I			I			I						K							M		SQV/r

ANNEXE 10 - Mutations de résistance aux INI identifiées à Angers et à Nantes

Echantillons	Laboratoire	Mutations identifiées impliquées dans la résistance au INI			Résistances
		<i>L74</i>	<i>G118</i>	<i>E138</i>	
E1	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E2	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E3	Angers				ES
	Nantes				Aucune
E4	Angers				Aucune
	Nantes				NR
E5	Angers				Aucune
	Nantes				AA
E6	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E7	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E8	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E9	Angers	I			Aucune
	Nantes	I/M			Aucune
E10	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E11	Angers		R/K/E/G		RAL-EVG-DTG
	Nantes				Aucune
E12	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E13	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E14	Angers				Aucune
	Nantes				AA
E15	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E16	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune
E17	Angers				Aucune
	Nantes			K	EVG
E18	Angers				Aucune
	Nantes				Aucune

Mise au point de la technique de génotypage de résistance du VIH-1 aux antirétroviraux sur l'ADN proviral au laboratoire de virologie du CHU d'Angers.

RÉSUMÉ

L'infection par le VIH touche près de 37 millions de personnes dans le monde. En 2015, 40% d'entre elles avaient accès à la thérapie antirétrovirale. La recherche de mutations de résistance ou test de génotypage de résistance sur ARN du VIH-1 est obligatoire avant l'initiation d'un traitement. Le génotypage sur ADN proviral du VIH-1, pourtant moins sensible est réalisé chez les patients ayant une charge virale indétectable et pour lesquels un changement thérapeutique est envisagé.

Notre objectif était de mettre au point cette technique de génotypage au laboratoire de virologie du CHU d'Angers à partir de 18 échantillons de sang total, déjà testés au CHU de Nantes. La détermination des conditions expérimentales et plusieurs ajustements du protocole ont été nécessaires pour comparer nos résultats à ceux de Nantes.

Nos différents essais et améliorations ont permis l'amplification de 71 gènes sur 72. Parmi les 90 interprétations, 73 ont pu être comparées entre les deux centres et nous avons une interprétation identique pour 53. Sur les 20 différences, seulement 11 conduisaient à un éventuel impact sur le choix de la stratégie thérapeutique.

Ce travail a montré qu'il existe des variabilités inter-laboratoires qui reposent essentiellement sur la qualité du séquençage, la présence de sous-populations virales chez un individu et la sensibilité de la technique. Cette analyse pose les limites de l'usage et de l'interprétation du génotype sur ADN proviral en pratique clinique. Avant son implantation à Angers, la technique devra néanmoins être testée sur l'ARN génomique du VIH-1 pour disposer d'un protocole unique adapté aux deux matrices. Une quantification préalable de l'ADN cellulaire du VIH-1 dans l'échantillon pourra aussi améliorer l'efficacité au laboratoire.

Mots clés : VIH-1, Résistances, Génotypage, Mutations, Séquençage direct, ADN proviral.

Implementation of HIV-1 genotypic resistance test to antiretroviral drugs using proviral DNA in the laboratory of virology at the University Hospital of Angers.

ABSTRACT

HIV infection affects about 37 million people worldwide. In 2015, about 40% of them had access to antiretroviral therapy. Identification of HIV-1 resistance mutations called genotypic resistance test using HIV-1 RNA is recommended before starting a treatment or at failure. Even though genotypic resistance test in HIV-1 proviral DNA is less sensitive, it is use for patients with undetectable plasma viral load who need a switch of antiretroviral therapy.

Our aim was to develop this genotypic resistance test in the laboratory of virology at the University Hospital of Angers. We used 18 whole blood samples already tested in the hospital laboratory of Nantes. To compare results from the both laboratories, we tested several experimental conditions to determine an optimal protocol.

Thanks to our different assays and improvements 71 genes among 72 were amplified. Among 90 resistance interpretations, 73 were able to be compared between the two laboratories and 53 were similar. Among the other 20 different interpretations, only 11 might influence the future choice of the antiretroviral regimen.

This work showed that variabilities between laboratories exist due to the quality of the standard Sanger sequencing, the detection of viral quasispecies in individual blood, and the sensitivity of this test. Our study underlines the limits of using and interpreting HIV-1 proviral DNA genotypes in clinical monitoring. Before being established in Angers, this assay should be adapted for the HIV-1 plasma RNA in order to have one unique experimental protocol suitable for DNA and RNA. A prior quantification of viral cellular DNA in samples could also improve effectiveness of this laboratory method.

Keywords : HIV-1, Resistances, Genotyping, Mutations, Direct sequencing, Proviral DNA.