

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE**  
**BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu devant le Jury interrégional**

**le 11 octobre 2005**

**par M. Nicolas GAUTIER**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN**  
**PHARMACIE**

*Distribution des sous-types du VIH-1 d'une cohorte de patients nantais : analyse du polymorphisme, impact sur la résistance.*

**Président :** Pr Berthe-Marie IMBERT (Université de Nantes)  
**Directeur de thèse :** Dr Virginie FERRE (Université de Nantes)  
**Membres du jury :** Pr François RAFFI (Université de Nantes)  
Dr Annick RUFFAULT (Université de Rennes)

# *Table des matières*

## Introduction

## Rappels bibliographiques

<b>1</b>	<b>STRUCTURE, ORGANISATION GÉNOMIQUE ET CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH. ....</b>	<b>9</b>
1.1	STRUCTURE .....	9
1.2	ORGANISATION GÉNOMIQUE .....	10
1.3	CYCLE DE RÉPLICATION .....	11
<b>2</b>	<b>LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH.....</b>	<b>13</b>
2.1	HISTORIQUE .....	13
2.1.1	<i>Les virus de l'immunodéficience simienne (SIV)</i> .....	13
2.1.2	<i>Origines de l'infection par le VIH</i> .....	13
2.2	CLASSIFICATION DES SOUCHES DU VIH .....	14
2.3	MÉCANISMES DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH.....	16
2.3.1	<i>Les mutations</i> .....	16
2.3.2	<i>Phénomène de recombinaison</i> .....	17
2.3.2.1	Mécanisme de recombinaison .....	17
2.3.2.2	Co-infection et superinfection .....	18
2.4	LES FORMES RECOMBINANTES CIRCULANTES .....	19
2.4.1	<i>Présentation</i> .....	19
2.4.2	<i>Organisation génomique des 16 CRFs</i> .....	20
2.5	DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES SOUS-TYPES ET CRF .....	22
2.6	CONSÉQUENCES DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH .....	26
2.6.1	<i>Dépistage</i> .....	26
2.6.2	<i>Transmission et progression de la maladie</i> .....	27
2.6.3	<i>Les vaccins</i> .....	28
2.6.4	<i>Traitement antirétroviral</i> .....	28
<b>3</b>	<b>MISE EN ÉVIDENCE DES SOUS-TYPES. ....</b>	<b>29</b>
3.1	LE SÉROTYPAGE .....	29
3.1.1	<i>Principe</i> .....	29
3.1.2	<i>Avantages et inconvénients</i> .....	29
3.2	TECHNIQUES BASÉES SUR LA POLYMÉRASE CHAIN RÉACTION (PCR).....	29
3.2.1	<i>Principe de la PCR</i> .....	29
3.2.2	<i>Hétéroduplex Mobility Assay (HMA)</i> .....	31
3.2.2.1	Principe.....	31
3.2.2.2	Avantages et inconvénients.....	31
3.2.3	<i>Polymorphisme conformationnel simple brin ou SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)</i> .....	32

3.2.3.1	Principe.....	32
3.2.3.2	Avantages et inconvénients.....	32
3.2.4	<i>Le séquençage</i> .....	33
3.2.4.1	Principe.....	33
3.2.4.2	Avantages et inconvénients.....	37
<b>4</b>	<b>VIRUS ET RÉSISTANCE.....</b>	<b>37</b>
4.1	LES ANTIRÉTROVIRAUX DIRIGÉS CONTRE LE VIH.....	37
4.2	RÉSISTANCE AUX ANTIRÉTROVIRAUX : MÉCANISMES.....	39
4.3	LES TESTS DE MESURE DE RÉSISTANCE.....	40
4.3.1	<i>Les tests phénotypiques</i> .....	40
4.3.1.1	Principe.....	40
4.3.1.2	Indications.....	41
4.3.2	<i>Les tests génotypiques</i> .....	41
4.3.2.1	Principe.....	41
4.3.2.2	Indications.....	42
4.3.2.3	Interprétation des tests de résistance génotypique.....	43
4.4	MUTATIONS ASSOCIÉES À LA RÉSISTANCE AUX ANTIRÉTROVIRAUX CHEZ LES PATIENTS TRAITÉS.....	46
4.4.1	<i>Les mutations associées à une résistance aux INTI</i> .....	46
4.4.2	<i>Mutations associées à une résistance aux INNTI</i> .....	48
4.4.3	<i>Mutations associées à une résistance aux IP</i> .....	48
4.5	LES MUTATIONS ASSOCIÉES À LA RÉSISTANCE AUX ANTIRÉTROVIRAUX CHEZ LES PATIENTS NON TRAITÉS.....	49

**1ère partie : Interférences analytiques des souches  
virales de type non B avec la technique de  
séquençage : exemple du sous-type J.**

## **Matériels et méthodes**

<b>1</b>	<b>LES PATIENTS.....</b>	<b>52</b>
<b>2</b>	<b>LES PRÉLÈVEMENTS.....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE ADAPTÉE AUX SOUCHES VIRALES DE TYPE B.....</b>	<b>54</b>

3.1	EXTRACTION .....	54
3.1.1	<i>Technique manuelle</i> .....	54
3.1.2	<i>Technique automatique</i> .....	56
3.2	AMPLIFICATION DE L'ARN PLASMATIQUE .....	56
3.2.1	<i>Choix des amorces</i> .....	56
3.2.2	<i>Etapas d'amplification</i> .....	58
3.2.3	<i>Migration électrophorétique des produits de PCR nichée</i> .....	61
3.2.4	<i>Purification des produits de PCR nichée</i> .....	61
3.2.5	<i>Réaction de séquence</i> .....	62
3.2.6	<i>Le séquençage</i> .....	63
3.2.7	<i>Les logiciels informatiques</i> .....	64
<b>4</b>	<b>TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE ADAPTÉE AUX SOUCHES VIRALES DE SOUS-TYPE J. ....</b>	<b>65</b>
4.1	EXTRACTION .....	65
4.2	AMPLIFICATION DE L'ARN PLASMATIQUE .....	65
4.2.1	<i>Choix des amorces</i> .....	65
4.2.1.1	Polymorphisme du sous-type J au niveau des sites de fixation des amorces .....	65
4.2.1.2	Polymorphisme de la forme recombinante CRF11 au niveau des sites de fixation des amorces.....	68
4.2.2	<i>Amplification, purification, réaction de séquence, séquençage</i> .....	69
<b>5</b>	<b>TYPAGE DU VIH.....</b>	<b>69</b>

## Résultats

<b>1</b>	<b>COHORTE ÉTUDIÉE.....</b>	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>UTILISATION DES AMORCES MJ4 J ET NE 135 J SPÉCIFIQUES DU SOUS-TYPE J.....</b>	<b>72</b>
<b>3</b>	<b>UTILISATION DES AMORCES MJ4 J ET NE 135-CRF11.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>SÉQUENÇAGE DE L'ARN ET TYPAGE DE LA SOUCHE DU PATIENT N°3.....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>ANALYSE DES RÉSULTATS .....</b>	<b>74</b>

# 2ème partie :Etude des sous-types non B de patients suivis au CISIH de Nantes entre 1997 et 2004

## Matériels et méthodes

1	LES PATIENTS.....	79
2	LES PRÉLÈVEMENTS .....	80
3	LA TECHNIQUE DE SÉQUENÇAGE .....	80
4	TYPAGE DU VIH.....	80

## Résultats

1	DISTRIBUTION DES SOUS-TYPES VIH-1 DANS LA COHORTE NANTAISE .....	82
1.1	CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS .....	82
1.2	DISTRIBUTION DES SOUS-TYPES NON B DANS LA COHORTE NANTAISE.....	85
1.3	EVOLUTION DE LA PROPORTION DES SOUCHES DE TYPE NON B À NANTES.....	88
2	ETUDE DE LA TRANSMISSION DE SOUCHES VIRALES RÉSISTANTES PARMIS LES SOUCHES DE TYPE B ET NON B.....	90
2.1	LES PATIENTS ET LES PRÉLÈVEMENTS .....	90
2.2	ETUDE DES SÉQUENCES CODANT POUR LA PROTÉASE ET LA TI DES PATIENTS NAÏFS	92
2.2.1	<i>Codons impliqués dans la résistance aux antirétroviraux.....</i>	92
2.2.1.1	Gène de la protéase .....	92
2.2.1.2	Gène de la TI.....	96
2.2.2	<i>Codons non impliqués dans la résistance aux antirétroviraux.....</i>	99
2.2.2.1	Gène de la protéase .....	99
2.2.2.2	Gène de la TI.....	100

## Discussion

## Annexe

## Bibliographie

# **Introduction**

La mise en place des thérapies antirétrovirales hautement actives (HAART) a permis de stabiliser la progression de la maladie liée au VIH-1 dans les pays occidentaux. Les connaissances actuelles sur la pathogénie du VIH, sur l'efficacité et l'utilisation des antirétroviraux ont été établies à partir de souches virales VIH-1 de sous-type B, prédominant dans nos régions. Or, ce sous-type n'est pas le plus fréquemment rencontré dans le monde et n'est présent que chez 12% des sujets nouvellement infectés, loin derrière le sous-type C (47%) et les sous-types A et apparentés (27%) (Osmanov, Pattou et al. 2002). L'augmentation depuis plusieurs années de la prévalence des souches de type non B dans les pays occidentaux et la découverte de formes virales recombinantes, a alerté les équipes de recherche sur la nécessité d'actualiser les connaissances sur l'impact de la diversité génétique du VIH-1. En effet, de nombreuses questions peuvent se poser : ces souches ont-elles une capacité de répllication et un pouvoir infectieux plus important ? Répondent-elles différemment aux traitements antirétroviraux ? Les examens virologiques réalisés actuellement sont-ils suffisamment performants pour faire face à cette diversité et assurer un suivi adéquat des patients séropositifs ?

C'est sur cette dernière interrogation que s'oriente la 1<sup>ère</sup> partie de notre travail : en effet, nous avons été confrontés, dans le cadre de la réalisation d'un génotype de résistance, aux difficultés d'amplification du gène codant pour la transcriptase inverse de souches appartenant au sous-type J du VIH-1.

Dans une 2<sup>ème</sup> partie, une étude épidémiologique rétrospective présente la distribution des sous-types du VIH-1 depuis 20 ans, sur une cohorte de 603 patients suivis au CISIH de Nantes. A la suite de cette étude, nous avons analysé, grâce à la technique de séquençage, le polymorphisme des souches de type non B chez 53 patients naïfs de tout traitement. En utilisant l'algorithme d'interprétation des résistances de l'ANRS (version 2005), nous avons pu définir d'éventuels profils de résistance thérapeutique des virus de type non B en les comparant à ceux d'une cohorte de patients naïfs dont la souche virale appartient au sous-type B.

## **Rappels bibliographiques**

# 1 Structure, organisation génomique et cycle de réplication du VIH.

Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus à acide ribonucléique (ARN) de la famille des *retroviridae*, se définissent par leur structure mais surtout par leur mode de réplication.

## 1.1 Structure

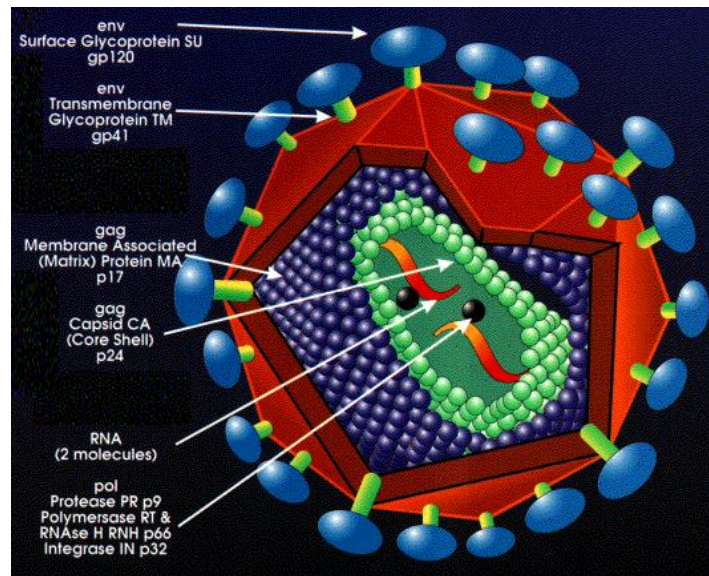
Les virions produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées sont des particules enveloppées de 90 à 120 nm de diamètre. Elles sont constituées d'un core viral emprisonné dans une capsid.

**Le core viral** comprend 2 molécules d'ARN, 3 protéines et des enzymes virales : la transcriptase inverse (TI), la protéase et l'intégrase.

**La capsid virale** est constituée de la protéine interne dite majeure (car en abondance) d'un poids moléculaire de 24 kDa : c'est la p24 CA. La protéine de nucléocapsid (p7 NC) est associée aux molécules d'ARN. La protéine de matrice ou p17 MA est la plus externe et est associée à la protéase.

**L'enveloppe virale** est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de 2 glycoprotéines virales : la glycoprotéine transmembranaire gp41, liée par des liaisons faibles à la glycoprotéine d'enveloppe externe gp120, l'ensemble faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules.

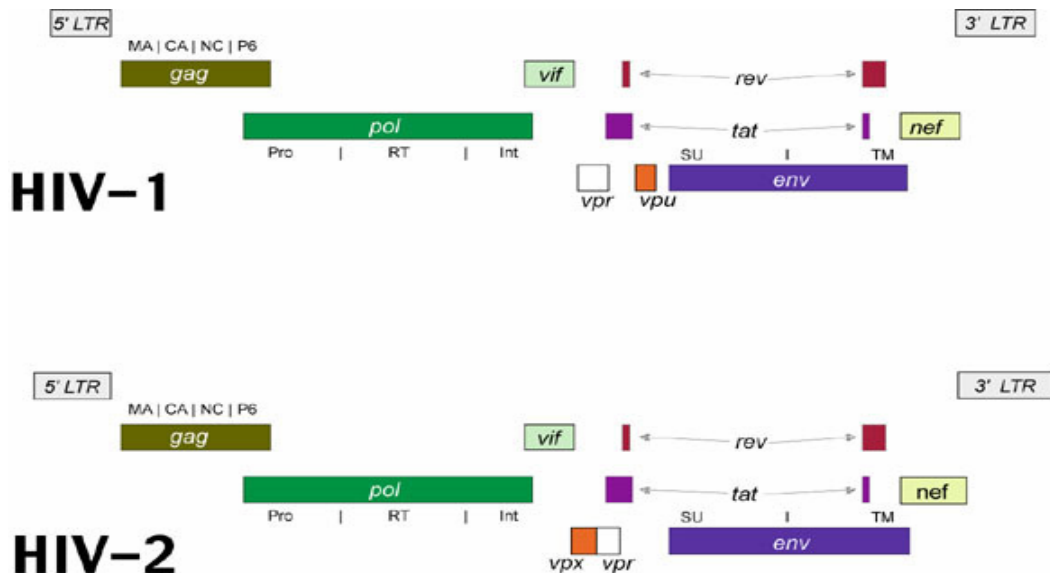
La structure générale du VIH-1 et 2 est similaire ; seuls changent les poids moléculaires des protéines et enzymes constitutives de ce virus.



**Figure 1:** Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (ARIC's AIDS Medical Image Gallery)

## 1.2 Organisation génomique

Comme tous les rétrovirus, le VIH a 3 gènes de structure, *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines internes, les 3 enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe. Ces 3 gènes de structure sont encadrés par 2 séquences répétitives appelées Long Terminal Repeat (LTR); ces dernières interviennent dans le contrôle de la transcription, puisqu'elles contiennent des éléments promoteurs nécessaires à l'expression des gènes; par ailleurs, elles participent à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Des gènes régulateurs de la réplication virale s'expriment lors de la multiplication du virus dans la cellule. On en connaît 6 : *tat* (transactivator), *rev* (regulator of viral protein expression), *nef* (negative factor), *vif* (virion infectivity factor), *vpr* (viral protein R) et *vpu* (viral protein U); leurs fonctions exactes ne sont pas toujours bien connues. Le gène *vpu*, facteur intervenant dans l'infectiosité du virus, est présent uniquement chez le VIH de type 1; le VIH-2 possède un autre gène régulateur appelé *vpx* (viral protein X) (figure 2). L'homologie globale entre VIH-1 et VIH-2 est de l'ordre de 50% au niveau des protéines internes et de 40% au niveau des glycoprotéines d'enveloppe.



**Figure 2: Organisation génomique du VIH-1 et 2**  
 ([http://www.aids.harvard.edu/lab\\_research/lab\\_profile.html](http://www.aids.harvard.edu/lab_research/lab_profile.html))

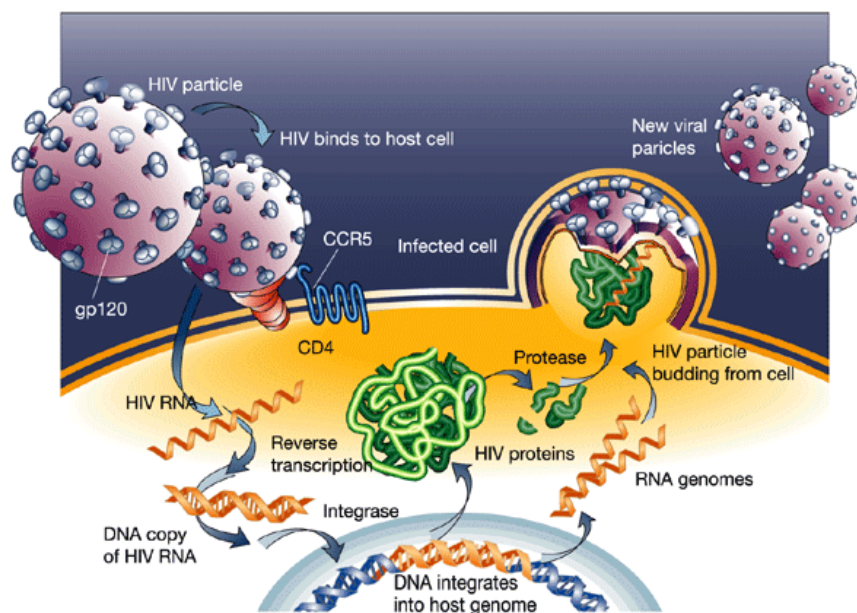
### 1.3 Cycle de réplication

Les VIH ont un tropisme pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les cellules de la lignée monocyte/macrophage. L'entrée dans la cellule cible nécessite l'attachement du virion à la surface cellulaire par fixation de la gp120 sur le récepteur CD4. Le changement conformationnel de la gp120 qui en résulte permet à une région spécifique de cette protéine, la boucle V3, de se fixer à des corécepteurs à la surface de la membrane cellulaire (récepteurs de chimiokines). De nombreux corécepteurs ont été identifiés mais deux semblent majoritairement utilisés par le VIH : CCR-5 et CXCR-4 dont le rôle normal est de reconnaître des chimiokines sécrétées par la cellule.

La fixation de la gp120 à ce corécepteur permet le démasquage d'un peptide de fusion appartenant à la gp41. Il en résulte une fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique cellulaire. La capsid virale est alors libérée dans le cytoplasme. Après décapsidation dans le cytoplasme, la synthèse d'un ADN double brin est catalysée par la transcriptase inverse à partir de l'ARN génomique viral. Le provirus migre vers le noyau sous forme de complexe nucléoprotéique et

s'intègre au génome cellulaire grâce à l'intégrase virale. Cette intégration se fait classiquement au hasard dans le génome cellulaire et conclut la phase précoce de la réplication virale.

La 2ème étape ou phase tardive, va conduire à la libération de nouveaux virus par la cellule sous le contrôle de facteurs cellulaires et de protéines de régulation virales. L'ADN proviral est transcrit par l'ARN polymérase II de la cellule hôte en ARN précurseur. L'épissage alternatif de ce dernier permet la génération des ARN codant pour chacune des protéines malgré les trames de lecture chevauchantes (figure 2). La traduction des ARN messagers dans le cytoplasme de la cellule donne naissance à des polyprotéines virales non clivées, codées d'une part par les gènes *gag* et *pol* et d'autre part par le gène *env*. Le précurseur gp160 codé par le gène *env* est clivé par une protéase cellulaire en 2 protéines d'enveloppe qui seront glycosylées par les enzymes de la cellule pour donner la gp120 et gp41. Quant à la polyprotéine *gag-pol*, c'est au moment du bourgeonnement du virus hors de la cellule qu'elle va être clivée par la protéase virale pour donner les protéines constitutives internes du virus et ses 3 enzymes. Cette étape de maturation confère au virion son caractère infectieux.



***Figure 3 : Cycle de réplication du VIH (ARIC's AIDS Medical Image Gallery)***

## **2 La diversité génétique du VIH**

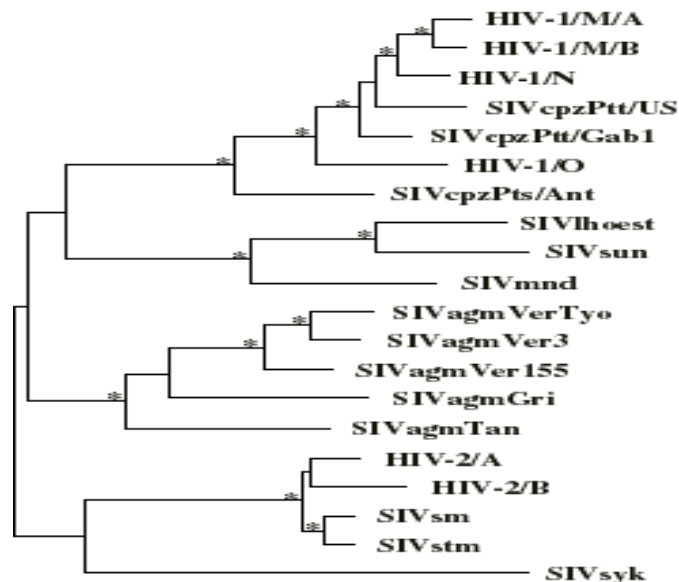
### **2.1 Historique**

#### **2.1.1 Les virus de l'immunodéficience simienne (SIV)**

Les virus de l'immunodéficience simienne, tout comme ceux de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et 2), appartiennent à la sous-famille des lentivirus de la famille des *retroviridae*. La 1ère souche de SIV a été isolée en 1985 de macaques rhésus en captivité présentant des signes cliniques semblables à ceux du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Daniel, Letvin et al. 1985); depuis, on estime qu'une trentaine d'espèces différentes de primates africains sont porteurs asymptomatiques et naturels du SIV (Hahn, Shaw et al. 2000) (Peeters, Courgnaud et al. 2002). L'absence de pathologies observées chez ces primates suggère une infection d'origine ancienne associée à une adaptation progressive et réciproque du virus à l'hôte. Certaines lignées de SIV semblent avoir coévolué parallèlement à leur hôte, d'autres semblent être le résultat de multiples épisodes de transmission interspèce survenus dans le passé entre primates et notamment l'homme (Hahn, Shaw et al. 2000) (Sharp, Bailes et al. 2000). Dans certains cas, lors d'un changement d'espèce, le virus peut devenir pathogène pour le nouvel hôte, c'est le cas pour le VIH-1 et 2.

#### **2.1.2 Origines de l'infection par le VIH**

L'origine de l'infection par le VIH-1 et 2 serait respectivement l'Afrique centrale et l'Afrique de l'ouest via une transmission zoonotique du SIV provenant de 2 réservoirs différents : l'arbre phylogénétique de la figure 4 montre que les VIH de type 2 sont phylogénétiquement très proches du SIV de mangabeys enfumés *cercocebus atys* (SIV sm), petits singes de l'ouest africain ; les VIH de type 1 et de groupe N ont eux, un lien étroit de parenté génétique avec des SIV présents chez le chimpanzé *pan troglodytes* (SIV cpz) d'Afrique centrale (Gao, Yue et al. 1992) (Gao, Bailes et al. 1999) (Hirsch, Olmsted et al. 1989).



**Figure 4 : Relations phylogénétiques des différents lentivirus de primates.**

Arbre construit à partir des séquences protéiques de *pol* selon la méthode neighbor joining. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive entre les différentes souches virales. Les astérisques indiquent des valeurs de bootstrap >80% (Beer, Bailes et al. 2000)

Les mécanismes permettant aux lentivirus de franchir la barrière d'espèce ne sont pas entièrement déterminés. La transmission virale entre le singe et l'homme pourrait avoir lieu dans certaines circonstances : morsure par un animal domestique ou lors d'un dépeçage d'un animal chassé. Une étude séroépidémiologique sur la viande de brousse vendue sur les marchés au Cameroun a montré que la population humaine était en contact avec une diversité considérable de SIV (Peeters, Courgnaud et al. 2002). La chasse et la consommation de cette viande ont toujours été pratiquées en Afrique sub-saharienne. La croissance accrue de ce commerce au cours des dernières décennies et l'essor de l'exploitation forestière permettant l'accès à des régions jusqu'alors préservées, ont considérablement augmenté le risque de contact de la population avec de nouveaux virus. De plus, la recombinaison entre SIV et VIH n'est pas à exclure.

## 2.2 Classification des souches du VIH

Le SIDA a été décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1981 aux Etats unis ; cette découverte fait suite à la recrudescence d'infections opportunistes habituellement rares telle la pneumonie à *pneumocystis carinii*, dans des populations homosexuelles (Masur,

Michelis et al. 1981). Le Lymphadenopathy Associated Virus 1 (LAV-1, futur VIH-1 dans la nomenclature) a été isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1983 (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). En 1985, un second virus du SIDA, le LAV-2 (futur VIH 2 dans la nomenclature), est isolé à partir d'un prélèvement effectué sur un malade originaire d'Afrique de l'ouest, hospitalisé au Portugal (Brun-Vezinet, Rouzioux et al. 1985). Les prévalences du VIH-2, localisé principalement en Afrique de l'ouest, sont stables et tendent à décroître (Jaffar S 2005); en revanche, le VIH-1 est répandu à travers l'Afrique et des lignées particulières ou sous-types de ce groupe se sont propagées dans le monde entier, rendant ainsi le VIH-1 globalement prédominant. On estime que l'expansion du VIH-1 a commencé dans les années 30 (Korber, Muldoon et al. 2000).

L'analyse phylogénétique de nombreuses souches du VIH-1 d'origines géographiques diverses a révélé trois grands groupes distincts de virus nommés M, N et O. La grande majorité des souches responsables de la pandémie appartient au groupe M. Les analyses des séquences des gènes *env* et *gag* ont permis de classer les virus de ce groupe en neuf sous-types : A, B, C, D, F, G, H, J et K. Au sein de ces derniers, certains sont divisés en sous-sous-types : F1 et F2 pour le sous type F, A1 et A2 pour le A. Il existe des souches « indéterminées » que l'on appelle U pour « unknow » ; ces isolats sont inclassables car ils sont uniques et n'appartiennent à aucun sous-type existant. (Robertson, Anderson et al. 2000). La différence des séquences nucléotidiques du gène *env* entre les sous-types est au moins de 20%. A l'intérieur d'un même sous-type, les divergences sont de l'ordre de 5 à 20%. Bien que les sous-types B et D soient classés dans 2 sous-types différents, pour cause historique, ils sont en fait proches l'un de l'autre et pourraient ainsi être regroupés dans un seul sous-type (Vidal N 2000).

Les isolats du groupe O ont été décrits pour la 1<sup>ère</sup> fois au début des années 90. Très divergents du groupe M, ils sont endémiques au Cameroun et dans les pays avoisinants (Gurtler, Hauser et al. 1994) (Jaffe and Schochetman 1998). Le groupe N (pour « new » non M, non O), de découverte récente, n'est représenté que par quelques isolats de patients camerounais (Simon, Mauclore et al. 1998) (Fonjungo,

Mpoudi et al. 2000). Il a été montré que ce groupe résulterait de la recombinaison d'un VIH-1 et d'un SIV (Gao, Bailes et al. 1999). Le VIH-2 est quant à lui divisé en 7 sous-types, de A à G (Peeters, Toure-Kane et al. 2003).

Du fait de sa variabilité importante, la classification du VIH-1 ne cesse d'évoluer avec notamment la caractérisation depuis une dizaine d'années de formes recombinantes circulantes inter sous-types (Peeters and Sharp 2000). Avant de les décrire plus précisément, nous allons étudier les mécanismes à l'origine de cette diversité.

### **2.3 Mécanismes de la variabilité génétique du VIH**

Les virus à ARN ont la capacité d'évoluer très rapidement grâce à des taux de mutation élevés (Preston, Poiesz et al. 1988) et des temps de génération très courts (Ho 1995); on estime à 10 milliards la production de nouveaux virus par jour pour une personne infectée. La source majeure de variation est le processus de réplication du génome au cours duquel des mutations et des recombinaisons peuvent se produire.

#### **2.3.1 Les mutations**

Le génome des virus à ARN est répliqué sous l'action d'une ARN polymérase ARN dépendante codée par leur propre génome. Ce type d'enzyme ne présente pas de système de correction des erreurs de réplication, à la différence des ADN polymérases ADN dépendantes. On estime pour le VIH que le taux intrinsèque des mutations dues uniquement aux erreurs d'incorporation de nucléotides par la polymérase serait de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  par nucléotide et par cycle de réplication (Mansky and Temin 1995); sachant que la taille du génome du VIH est de 9181 nucléotides, près d'une erreur serait faite par génome et par cycle de réplication. Ces mutations peuvent être muettes, létales, neutres ou modifier la structure protéique d'une partie du virus comme par exemple la TI ou la protéase, conférant au virus une sensibilité diminuée aux antirétroviraux. La plupart des mutations

résultent de la substitution d'une ou deux bases ; celle-ci peut aboutir, lors de l'étape de traduction, à la synthèse d'un nouvel acide aminé ; il existe des mutations par insertion de nucléotides pouvant entraîner la synthèse de nouveaux acides aminés et/ou déplacer le cadre de lecture de la séquence. Elles sont beaucoup moins fréquentes mais peuvent conférer une forte résistance aux antirétroviraux. La variabilité importante du VIH a été remarquée dès 1985, date à laquelle les premières séquences nucléotidiques furent publiées.

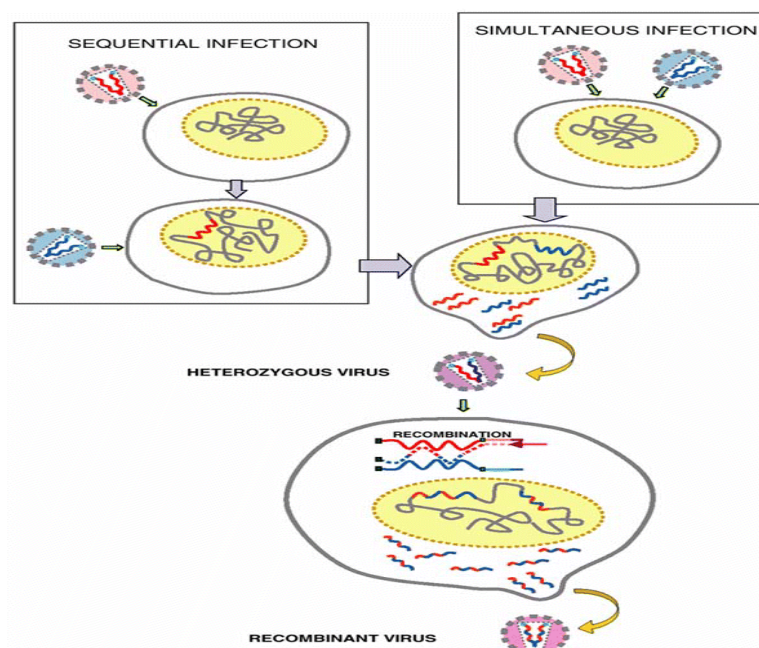
La variabilité génétique n'est pas la même tout au long du génome : *gag* et *pol* sont relativement conservés alors que *env* est très variable. Il n'existe pas de souches virales identiques et, chez un même malade, le virus est présent sous forme d'une population virale polymorphe avec une multitude de génomes différents. Chez le sujet récemment infecté au cours et au décours de la primo-infection, les virus circulants sont génétiquement très homogènes et cela même si, chez le sujet contamineur de nombreuses souches étaient présentes. Cette population virale homogène va évoluer avec un taux global de changement estimé à 1 % par an pour le gène *env* et 0,5 % pour le gène *gag* (Shankarappa R 1999). Une mixture complexe de variants ou quasi-espèces va apparaître progressivement et évoluer de façon différente et indépendante au niveau des différents tissus et cellules (sperme et lymphocytes par exemple) (Peeters 2001) (Perrin, Kaiser et al. 2003). Une hétérologie génétique de l'ordre de 15% peut être observée chez un même individu entre plusieurs quasi-espèces (Lukashov VV 2002).

## **2.3.2 Phénomène de recombinaison**

### **2.3.2.1 Mécanisme de recombinaison**

Les recombinaisons jouent un rôle central dans l'évolution du VIH-1 (Jetzt, Yu et al. 2000). Pour qu'un phénomène de recombinaison ait lieu, il faut que 2 ou plusieurs provirus intègrent leur génome dans une seule et même cellule. La figure 5 illustre ce mécanisme. Ces provirus peuvent appartenir au même sous-type ou à des sous-types différents. La cellule peut ensuite transcrire l'intégralité du génome

des 2 virus. Lors de l'encapsidation, le virus peut intégrer des copies différentes d'ARN de chaque variant et ainsi former un virus dont l'ARN est sous forme d'hétérodimère. Ce virus peut ensuite infecter une autre cellule et la recombinaison entre les 2 brins d'ARN différents peut avoir lieu durant le processus de transcription. La recombinaison ne peut se faire qu'entre 2 brins d'ARN inclus dans le même virion. Rhodes et al. ont évalué à environ 50% le taux de recombinaisons chez le VIH-1 entre des marqueurs distants de 1kb, soit un taux de  $5.10^{-5}$  par nucléotide et par cycle de réplication (Rhodes, Wargo et al. 2003).



**Figure 5 : Représentation schématique du processus de recombinaison entre 2 souches virales (Najera, Delgado et al. 2002)**

### 2.3.2.2 Co-infection et superinfection

On parle de coinfection VIH lorsqu'un individu est infecté par 2 types différents de VIH avant la séroconversion. La superinfection concerne un individu déjà séropositif pour le VIH et réinfecté au cours de sa maladie par une autre souche.

Superinfection et coinfection entre sous-types donnent lieu à des formes recombinantes (Jost, Bernard et al. 2002) (Fang, Weiser et al. 2004). Les mutations et les recombinaisons sont la source d'une grande variabilité génétique

qui confère au virus un grand pouvoir d'adaptation par rapport à son hôte et ainsi une extraordinaire capacité d'échappement aux réponses immunes et au traitement. Cette dérive génétique est l'obstacle majeur à l'obtention d'un vaccin efficace.

## **2.4 Les formes recombinantes circulantes**

### **2.4.1 Présentation**

Suite à la désignation des sous-types du groupe M, il s'est avéré que certains isolats n'ont pu être classés lors de l'analyse phylogénétique (Sharp, Bailes et al. 1999); cela suggère que ces virus sont probablement des formes recombinantes. Comme nous l'avons vu précédemment, leur génome résulte de recombinaisons entre différents sous-types. Certains génomes de virus recombinants sont uniques ou limités à des petits groupes de transmission ; d'autres formes recombinantes, identifiées chez plusieurs individus non apparentés, jouent un rôle majeur dans l'épidémiologie globale du SIDA. Elles sont actuellement appelées Circulating Recombinant Forms ou CRFs (Carr, Salminen et al. 1998).

Les CRFs doivent se ressembler entre eux sur le génome entier avec les mêmes points de recombinaison, reflétant ainsi un ancêtre commun d'un même phénomène de recombinaison. On dénombre actuellement 16 CRFs pour le VIH-1 (LosAlamosNationalLaboratory 2005). Chacun est désigné par un numéro d'identification (1 à 16) avec selon les cas, les lettres qui indiquent les sous-types d'origine impliqués dans la recombinaison (Sharp, Bailes et al. 1999). Si le génome contient des séquences provenant de plus de 2 sous-types, les lettres sont remplacées par « cpx » qui signifie complexe.

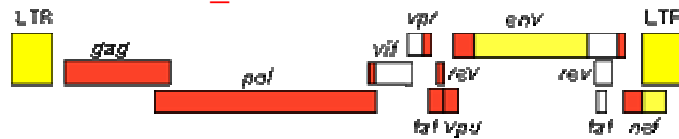
Les recombinaisons semblent se produire plus facilement entre des sous-types viraux proches phylogénétiquement, par exemple les VIH-1 sous-types A et G (Sharp, Bailes et al. 1999) (Montavon, Toure-Kane et al. 2000). Elles existent cependant entre des groupes phylogénétiquement divergents ; par exemple une forme recombinante complexe entre un virus du groupe O et un sous-type D et A/G a été mis en évidence chez des patients co-infectés au Cameroun (Takehisa,

Zekeng et al. 1999). Aucun cas de recombinaison entre le VIH-1 et 2 n'a été rapporté.

### 2.4.2 Organisation génomique des 16 CRFs.

Les schémas suivants représentent l'organisation génomique des 16 formes recombinantes circulantes déjà décrites dans la littérature.

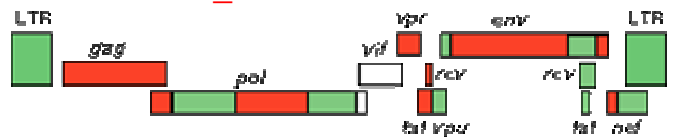
Nom: **CRF01\_AE**



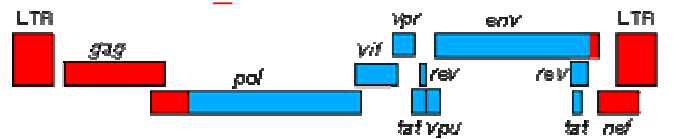
Sous-types impliqués :



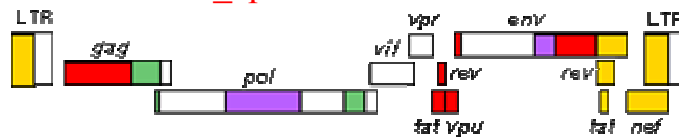
Nom: **CRF02\_AG**



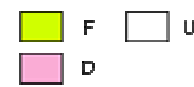
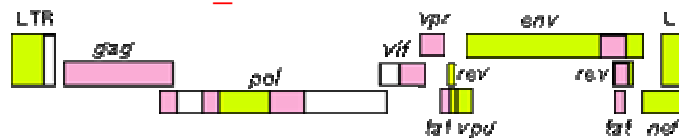
Nom: **CRF03\_AB**



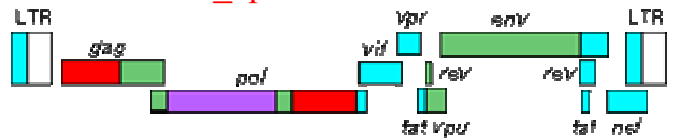
Nom: **CRF04\_cpx**



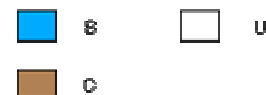
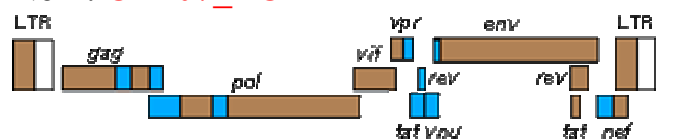
Nom: **CRF05\_DF**



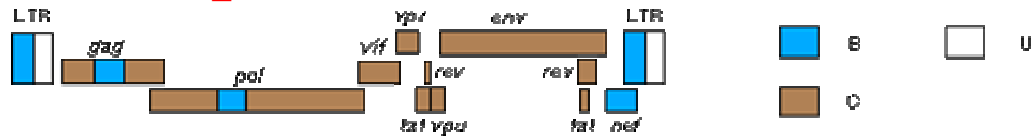
Nom: **CRF06\_cpx**



Nom: **CRF07\_BC**

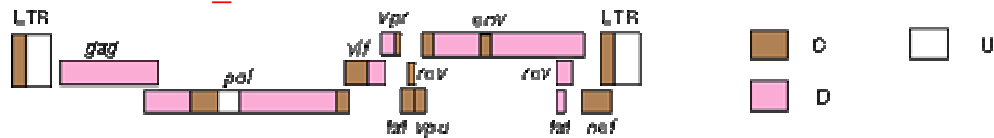


Nom: **CRF08\_BC**

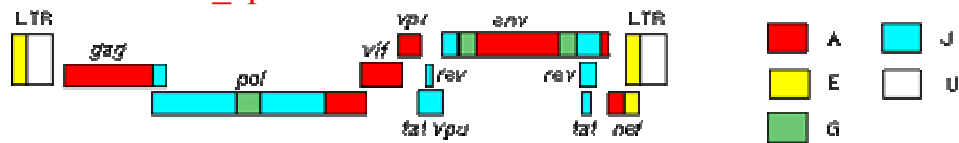


Nom: **CRF09\_cpx** : Séquence non disponible

Nom: **CRF10\_CD**



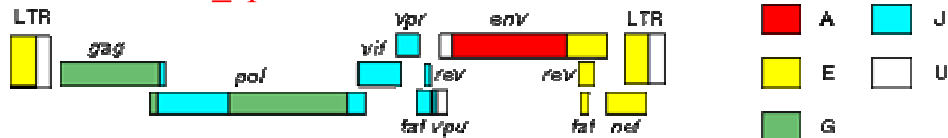
Nom: **CRF11\_cpx**



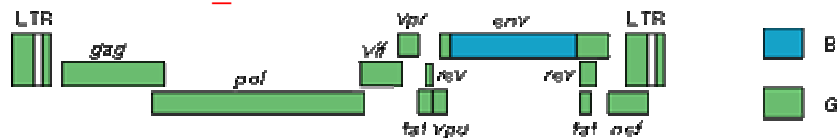
Nom: **CRF12\_BF**



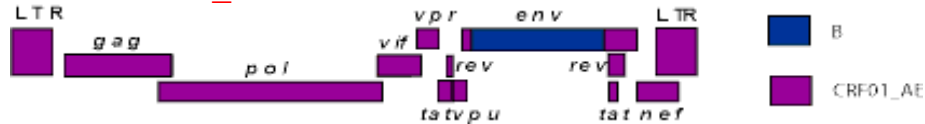
Nom: **CRF13\_cpx**



Nom: **CRF14\_BG**



Nom: **CRF15\_01B**



Nom: **CRF16\_A2D**



**Figure 6: Organisation génomique des 16 formes recombinantes circulantes. (LosAlamosNationalLaboratory 2005).**

## **2.5 Distribution géographique des sous-types et CRF**

La répartition géographique des sous-types diffère selon l'ancienneté de l'épidémie dans la région et le sous-type fondateur dans le groupe d'individu concerné. Une très grande hétérogénéité des sous-types est constatée en Afrique où tous les variants circulent. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ce continent est la source de l'épidémie. Le sous-type C est le plus représenté dans le monde, on le trouve en prédominance en Inde, Chine, Afrique du sud et Ethiopie ; en 2000, il représentait 47% des souches de patients nouvellement diagnostiqués ; venaient ensuite les sous-types A et ses formes recombinantes CRF01\_AE et CRF02\_AG (30%) puis le B (12%) (Osmanov, Pattou et al. 2002). Le sous-type B correspond à la forme responsable de l'épidémie apparue dans les pays industrialisés au début des années 80 (Amérique du Nord, Europe, Australie, Japon). Elle constitue aujourd'hui encore la forme prédominante dans ces régions.

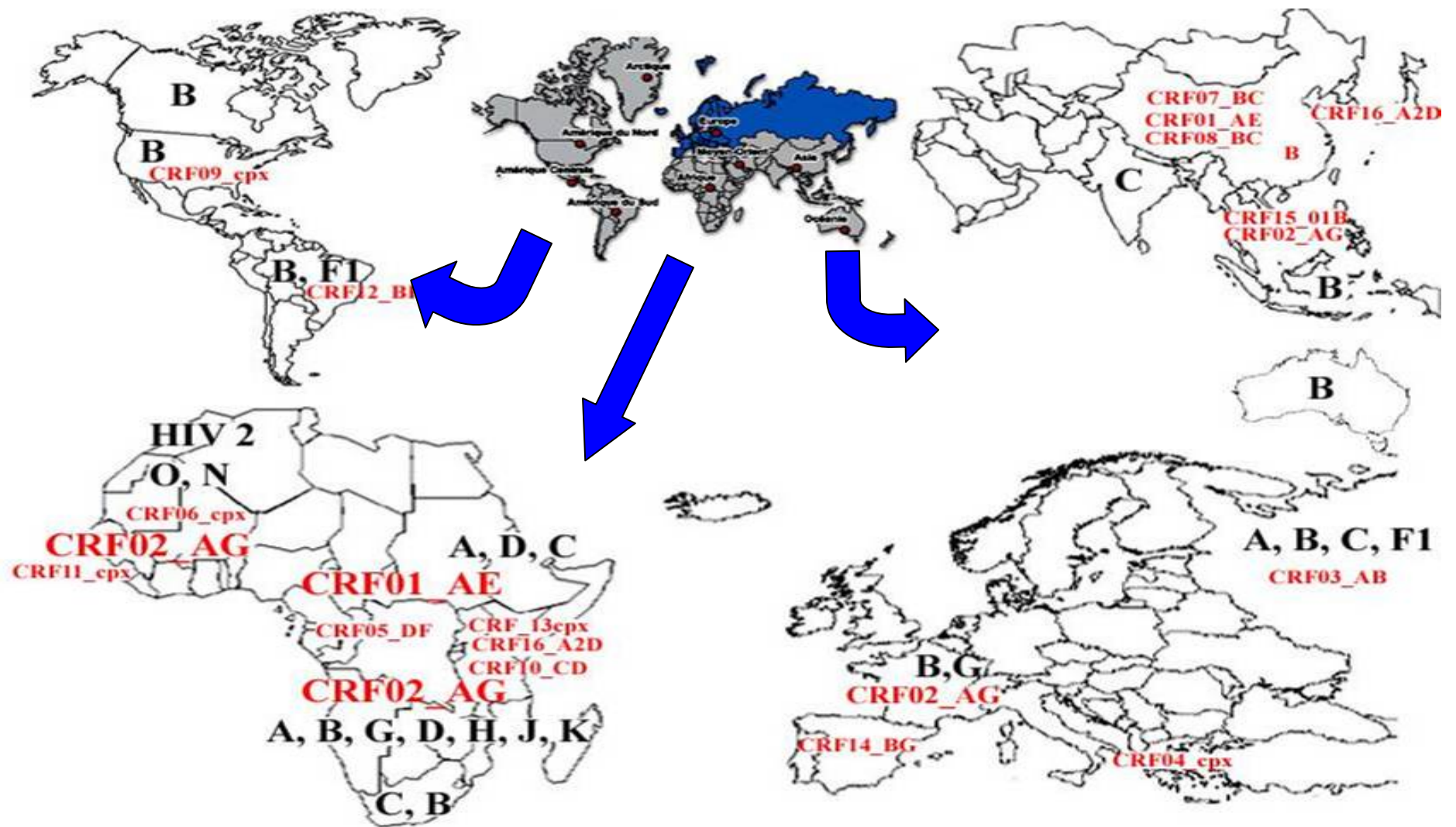
La 1<sup>ère</sup> forme recombinante identifiée en 1992, en Thaïlande, fût le CRF01\_AE (Ou, Takebe et al. 1992) (McCutchan, Hegerich et al. 1992); classée initialement en sous-type E sur les bases de l'analyse de la région *env*, cette souche a finalement été rapprochée du sous type A. Ce « sous-type E » était probablement un recombinant A/E d'origine Africaine introduit plus tard en Thaïlande (Carr, Salminen et al. 1996). Il y est rapidement devenu prédominant. Une autre hypothèse suggère que le CRF01\_AE n'est pas recombinant et serait en fait un sous-sous-type A (Anderson, Rodrigo et al. 2000). En 2001, une forme recombinante AE/B a été identifiée chez un homme d'origine thaïlandaise, montrant ainsi une évolution continue des CRFs (Tovanabutra et al. 2003).

Une autre forme recombinante importante est la CRF02\_AG prédominante dans l'ouest et le centre Africain ; elle serait responsable de près de 50 % des infections VIH dans ces régions (Peeters, Esu-Williams et al. 2000) (Carr, Torimiro et al. 2001) (Andersson, Norrgren et al. 1999) (Mboudjeka, Bikandou et al. 1999).

Par ailleurs, elle représente la 4<sup>ème</sup> forme la plus répandue dans le monde après les sous-types C, B et A.

La CRF03\_AB a vu sa prévalence augmentée rapidement chez les toxicomanes intraveineux de Kaliningrad en Russie (Peeters and Sharp 2000) (Liitsola, Tashkinova et al. 1998); par ailleurs, l'Amérique du sud, et plus particulièrement le Brésil et l'Argentine, a vu l'émergence du recombinant CRF12\_BF, résultant de la recombinaison des sous-types B et F, fréquents dans ces régions (Sabino, Shpaer et al. 1994) (Thomson, Delgado et al. 2002) (Espinosa, Vignoles et al. 2004).

Compte tenu de la présence de nombreux sous-types cocirculants, une grande fréquence et une diversité considérable de recombinants ont été rapportées en Afrique (Janssens, Buve et al. 1997). La prévalence de ces souches devient de plus en plus importante dans certaine région du globe. Une augmentation de la prévalence des sous-types autre que le B (dont les formes recombinantes) a été signalée dans certains pays d'Europe de l'ouest notamment en France : une étude des primo-infections à VIH en France en 1999-2000 a révélé que 19% des sous-types étaient non B ; en 2003, parmi 1019 personnes nouvellement diagnostiquées entre mars et septembre, 705 souches virales ont pu être typées, parmi elles 48 % étaient non B (BEH 2004). La figure 7 montre la répartition géographique mondiale des différents sous-types du VIH-1.



*Figure 7 : Répartition géographique des sous-types et formes recombinantes du VIH-1.*

**Tableau I: Les 16 CRFs : tableau récapitulatif.**

<b>Formes recombinantes circulantes</b>	<b>Souche de référence</b>	<b>Sous-types impliqués</b>	<b>Origine géographique</b>
<b>CRF01_AE</b>	CM240	A, E	<b>Afrique centrale, Asie</b>
<b>CRF02_AG</b>	IbNG	A, G	<b>Afrique centrale et de l'ouest, Taïwan</b>
<b>CRF03_AB</b>	Kal153	A, B	<b>Russie (Kaliningrad), Ukraine</b>
<b>CRF04_cpx</b>	94CY032	A, G, H, K, U	<b>Chypre, Grèce</b>
<b>CRF05_DF</b>	VI1310	D, F	<b>Congo, Zaïre</b>
<b>CRF06_cpx</b>	BFP90	A, G, J, K	<b>Burkina faso, Mali</b>
<b>CRF07_BC</b>	CN54	B', C	<b>Chine</b>
<b>CRF08_BC</b>	GX-6F	B', C	<b>Chine</b>
<b>CRF09_cpx</b>	96GH2911	pas encore publié	<b>Etats-Unis</b>
<b>CRF10_CD</b>	TZBF061	C, D	<b>Tanzanie</b>
<b>CRF11_cpx</b>	GR17	A, CRF01_AE, G, J	<b>Sierra Léone</b>
<b>CRF12_BF</b>	ARMA159	B, F	<b>Argentine, Uruguay</b>
<b>CRF13_cpx</b>	96CM-1849	A, CRF01_AE, G, J, U	<b>Ouganda, Zaïre</b>
<b>CRF14_BG</b>	X397	B, G	<b>Espagne</b>
<b>CRF15_01B</b>	99TH.MU2079	CRF01_AE, B	<b>Thaïlande</b>
<b>CRF16_A2D</b>	KISII5009	A2, D	<b>Kenya, Corée du sud</b>

## **2.6 Conséquences de la diversité génétique du VIH**

### **2.6.1 Dépistage**

Actuellement, le dépistage de l'infection à VIH se fait par la détection des anticorps dirigés contre le virus dans le sérum du patient. Légalement, 2 techniques différentes doivent être utilisées ; ces examens utilisent des techniques de type ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) suffisamment sensibles pour éviter les résultats faussement négatifs.

Ces méthodes, basées sur le principe du sandwich, utilisent des antigènes viraux synthétiques fixés au fond d'une cupule (protéines d'enveloppe et de capsid des VIH-1 et 2). Ces antigènes présentent des épitopes différents selon les tests, rendant ces derniers complémentaires et améliorant ainsi la sensibilité du dépistage. Les peptides synthétiques capturent les anticorps spécifiques s'ils sont présents dans le sérum. La révélation se fait en ajoutant un anticorps anti-immunoglobuline humaine couplé à une enzyme. L'ajout de son substrat entraîne l'hydrolyse de celui-ci et génère une coloration dont on apprécie l'intensité. Il existe des tests combinés détectant à la fois les anticorps dirigés contre le VIH mais aussi l'antigène de core p24 du VIH-1, généralement décelable pendant une courte période précédant la séroconversion. En cas de positivité de l'un ou des deux tests, un Western Blot de confirmation est pratiqué.

Initialement, le groupe O a été identifié car il n'était pas détecté par certains kits commerciaux (Loussert-Ajaka, Ly et al. 1994); depuis, il est dépisté grâce à l'utilisation d'antigènes croisés avec le groupe M ou par addition d'antigènes spécifiques du groupe O. La variabilité génétique observée pour le VIH pourrait remettre en question la capacité des trousse de dépistage à détecter les anticorps dirigés contre le virus. En 1996, Apetrei et al. ont montré que les anticorps retrouvés dans les sérums de patients récemment infectés par un VIH de type non B étaient moins bien détectés que ceux de patients primo-infectés par des sous-types B (Apetrei, Loussert-Ajaka et al. 1996). L'évaluation des trousse de dépistage de l'antigène p24 et celle des trousse combinées (anticorps et antigène

p24) ont montré que ces marqueurs d'infectiosité, présents dans les prélèvements précoces de patients infectés par des souches non B, étaient plus difficilement détectables que ceux de patients infectés par des isolats du sous-type B (Courouce 1999).

Un nombre important d'études a rapporté des difficultés dans la quantification des charges virales plasmatiques ; en effet, la variabilité génétique du virus peut entraîner une moins bonne fixation des amorces et une totale impossibilité de quantifier le virus pour certains sous-types (Coste, Montes et al. 1996) (Jackson, Piwowar et al. 1997) (Parekh, Phillips et al. 1999). Au fur et à mesure de l'évolution du virus, les tests de dépistage, la détermination de la charge virale ou encore le séquençage sont autant de techniques qui nécessiteront d'être régulièrement réévaluées afin de garder une bonne spécificité.

### **2.6.2 Transmission et progression de la maladie**

Les différences entre le VIH-1 et 2 ont été clairement établies au niveau de la transmission et de la progression de la maladie : le VIH-2 montre un taux moins élevé de transmission homosexuelle, une quasi absence de transmission verticale et une plus longue période d'incubation avant le développement du SIDA (Jaffar S 2005). Cette différence entre sous-types du VIH-1 ne semble pas clairement établie et donne lieu à des résultats contradictoires : une étude prospective impliquant une cohorte de prostituées du Sénégal a montré que les femmes infectées par les virus du sous-type A étaient 8 fois moins susceptibles de développer le SIDA (Kanki, Hamel et al. 1999) ; aucune différence dans la progression de la maladie n'a été observée chez les patients infectés avec les sous-types B et C en Israël (Weisman Z 1999) ou parmi les patients infectés avec les sous-types A, B, C et D en Suède (Alaeus, Lidman et al. 1999). Des études épidémiologiques dans différentes régions du globe permettront de déterminer si les différences observées sont en relation avec les propriétés intrinsèques du virus ou sont dues à des facteurs dépendants de la population.

### **2.6.3 Les vaccins**

La mise au point d'un vaccin efficace contre le VIH s'avère longue et difficile. Les vaccins à l'étude sont basés pour la plupart sur les antigènes des virus du sous-type B. Une protection croisée contre les autres sous-types n'est pas démontrée et les études à ce sujet sont contradictoires (Peeters 2001). Les recombinaisons survenant dans le génome du VIH provoquent l'accumulation de mutations permettant au virus d'échapper à la pression immunitaire induite par le vaccin. Il faudrait un vaccin capable de générer des anticorps contre tous les sous-types existants. De plus, il devra subir des modifications constantes en parallèle à l'évolution du VIH.

### **2.6.4 Traitement antirétroviral**

Les traitements antirétroviraux ne sont pas encore largement utilisés dans les pays en voie de développement où les sous-types non B prédominent. La totalité de nos connaissances sur les résistances du VIH aux antirétroviraux est issue de données établies à partir du sous-type B, prédominant dans les pays occidentaux. On connaît la résistance naturelle du VIH-2 et du VIH-1 groupe O aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) (Descamps, Collin et al. 1997) mais les données restent très limitées pour les autres sous-types : en 1998, Apetrei et al. décrivent une moins bonne sensibilité au TIBO (INNTI) de souches virales appartenant au sous-type F (Apetrei, Descamps et al. 1998). La même année, Descamps et al montrent une moins bonne sensibilité de certaines souches virales de type G aux inhibiteurs de la protéase (IP) (Descamps, Apetrei et al. 1998). Par ailleurs, des mutations de polymorphisme associées à une résistance mineure aux IP sont fréquemment retrouvées pour des souches virales de type non B (Vergne, Peeters et al. 2000).

### **3 Mise en évidence des sous-types.**

#### **3.1 Le sérotypage**

##### **3.1.1 Principe**

Les techniques immuno-enzymatiques de type ELISA utilisent des peptides synthétiques spécifiques de groupe et de sous-type, le but étant de trouver dans le sérum les anticorps capables de s'y fixer.

##### **3.1.2 Avantages et inconvénients**

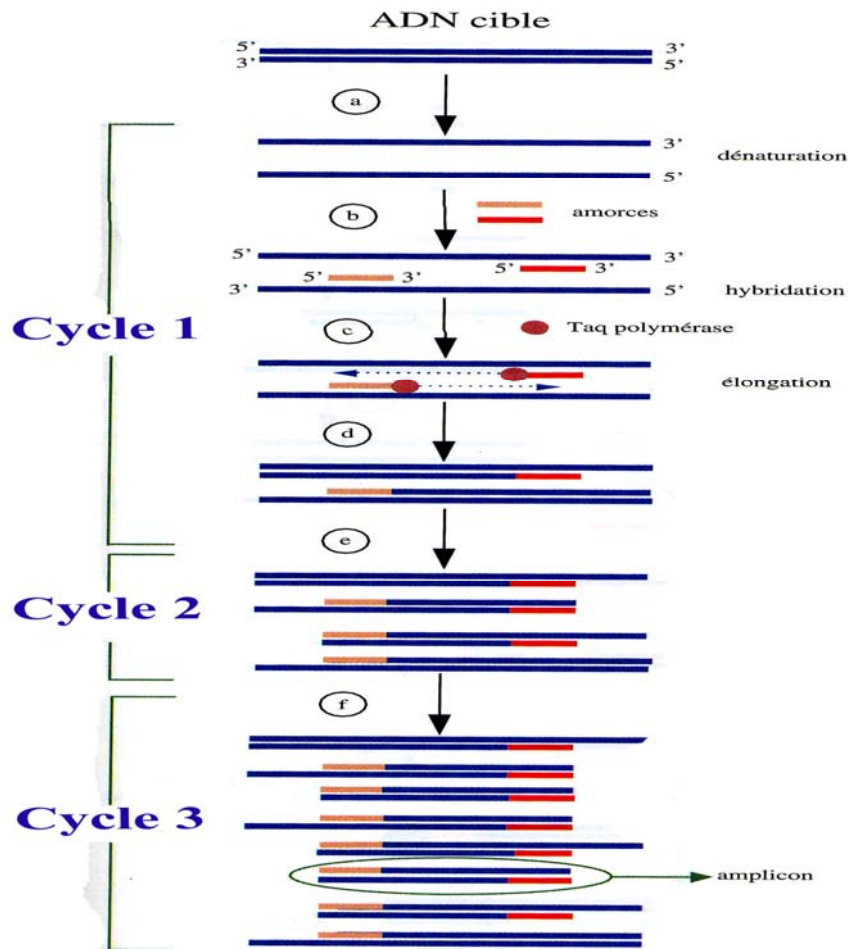
Les tests sérologiques sont d'utilisation simple, peu onéreux et un grand nombre d'échantillons peut être testé à la fois. Les peptides synthétiques de la boucle V3 de l'enveloppe ont été utilisés avec succès pour distinguer les infections dues au VIH-1 des groupes M, N et O (Lasky, Perret et al. 1997) (Mauclere, Damond et al. 1997). Cependant, cette méthode est moins performante pour la détermination des sous-types du groupe M ; en effet, il est impossible de différencier les sous-types A et C. Par ailleurs, les formes recombinantes ne sont pas détectées. Ces techniques ELISA sont utiles dans les endroits où un nombre limité de variants circule. La technique s'est avérée efficace en France pour distinguer les infections dues aux sous-types B et non B (Couturier, Damond et al. 2000) ; le centre national de référence basé à Tours l'utilise à des fins épidémiologiques. La spécificité vis-à-vis du sous-type B est de l'ordre de 86%. Cependant, dans les régions où plusieurs sous-types circulent, le sérotypage peut conduire à des erreurs d'identification (Hoelscher, Hanker et al. 1998) (Nkengasong, Willems et al. 1998).

#### **3.2 Techniques basées sur la Polymérase Chain Réaction (PCR).**

##### **3.2.1 Principe de la PCR**

La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis (Saiki, Scharf et al. 1985). Cette méthode permet d'amplifier *in vitro* une partie spécifique d'un acide nucléique donné (ADN ou ARN) afin d'en obtenir une

quantité suffisante pour le détecter. Les étapes communes à toutes les techniques de PCR sont décrites dans la figure ci-dessous.



**Figure 8:** Schéma de l'amplification d'une séquence d'ADN par PCR: produits formés au cours des trois premiers cycles.

*Premier cycle : dénaturation thermique de l'ADN (a) ; Hybridation des amorces à leur séquence complémentaire (b) ; élongation des amorces par la Taq polymérase dans le sens 5' 3' (c). Obtention de deux copies de chaque séquence cible à la fin du 1<sup>er</sup> cycle (d), 4 au second (e) et 8 au troisième (f) (Bogard M 1998)*

Un programme de PCR comprend n cycles identiques caractérisés par 3 températures successives, une élevée pour séparer les brins, une relativement basse pour l'hybridation des amorces à la cible et une intermédiaire pour la synthèse des copies par élongation des amorces. De nombreuses techniques basées sur ce principe ont été développées et adaptées à la détermination des différents groupes et sous-types du VIH.

La PCR dite nichée ou Nested PCR correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant de nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité par rapport à la simple PCR ; malgré tout, elle est contraignante du fait des contaminations possibles lors du transfert des produits de première PCR dans le tube réactionnel utilisé pour la PCR nichée.

### **3.2.2 Hétéroduplex Mobility Assay (HMA).**

#### **3.2.2.1 Principe**

Un ADN brin positif hybridé à son complémentaire négatif parfaitement apparié est appelé homoduplex. Un ADN brin positif hybridé à son complémentaire négatif avec la présence d'une variation dans la séquence sur un des 2 brins (mis-appariement) est appelé hétéroduplex. Ce mis-appariement modifie la conformation spatiale de la molécule d'ADN bicaténaire et par conséquent sa migration lors d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide. Cette technique met en évidence les variations de mobilité électrophorétique des brins d'ADN hétéroduplex formés par hybridation d'une séquence amplifiée avec des séquences de référence de différents sous-types (Delwart, Shpaer et al. 1993).

#### **3.2.2.2 Avantages et inconvénients**

Cette technique de PCR est peu sophistiquée et peu onéreuse ; elle est largement utilisée dans les pays en voie de développement, pour identifier les sous-types au niveau de l'enveloppe. Néanmoins, elle reste limitée car, au fur et à mesure que de nouvelles régions génomiques sont étudiées, les amorces d'amplification utilisées ne sont pas toujours suffisamment spécifiques et un certain nombre d'échantillons reste indéterminé. Pour pallier à cela, il est nécessaire d'alimenter constamment les banques de génomes de référence. Par ailleurs, le HMA ne peut pas distinguer les virus des sous-types A et CRF02\_AG dans l'enveloppe. Un HMA a été développé récemment pour caractériser les génotypes du gène *gag* ; il peut cette fois

distinguer les sous-types A des CRF02\_AG. En utilisant simultanément le HMA du *gag* et celui de *env*, on peut avoir des estimations préliminaires sur la fréquence des virus recombinants (Heyndrickx, Janssens et al. 2000).

### **3.2.3 Polymorphisme conformationnel simple brin ou SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)**

#### **3.2.3.1 Principe**

Les ADN simple brin présentent une certaine mobilité dans un gel de polyacrylamide non dénaturant du fait de sa conformation spatiale. La présence d'une mutation ou d'un polymorphisme de séquence (différents sous-types) altère cette conformation et provoque une variation de migration de l'ADN en gel non dénaturant par rapport à l'ADN normal.

Cette technique a été adaptée à l'étude de brin d'ARN : on parle alors de SSCP-ARN ou rSSCP. L'ARN a l'avantage d'être plus sensible aux modifications de conformation que l'ADN. En effet, l'ARN présente de nombreuses conformations métastables visibles sur un gel d'acrylamide non dénaturant. Par conséquent, une modification ponctuelle de séquence peut modifier considérablement la conformation de l'ARN, bien plus que celle de l'ADN correspondant. Les résultats sont obtenus après révélation du gel en bromure d'éthidium (une coloration à l'argent ou un marqueur radioactif peuvent aussi être utilisés). La SSCP a été adaptée en électrophorèse capillaire ; la migration peut aussi être réalisée sur un séquenceur automatique (utilisation d'une amorce ou d'un désoxynucléotide marqué avec un fluorochrome). (Bogard M 1998).

#### **3.2.3.2 Avantages et inconvénients**

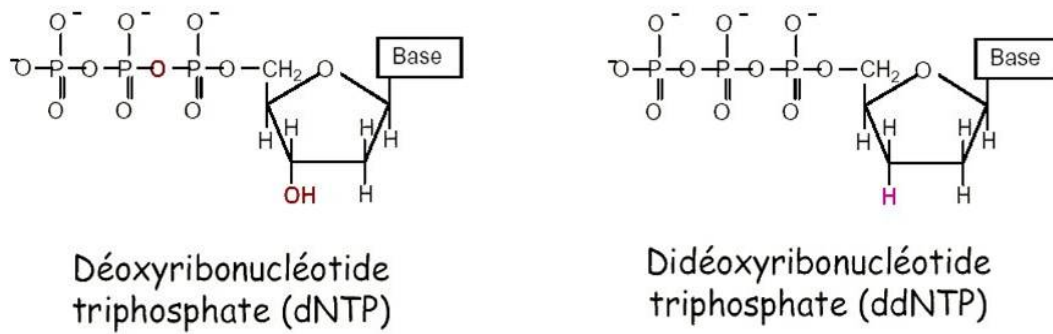
Des fragments de 300 à 400 paires de base peuvent être étudiés par cette technique. Globalement, on estime que cette technique permet la détection d'environ 90% des mutations (pour des fragments de 300 pb). Le rendement de la SSCP diminue avec la taille du fragment analysé. Quand la migration est réalisée sur gel d'acrylamide,

la bande anormale peut être élue pour analyse : on peut effectuer une PCR ou, après purification du fragment, réaliser une réaction de séquençage direct. La plupart des techniques utilisant les propriétés de migration sur gel de l'ADN dispose d'un ensemble de programmes informatiques permettant de déterminer la faisabilité de la technique et de définir les conditions optimales de mise en œuvre de celle-ci. En effet, la modélisation informatique de la structure secondaire de l'ADN permet de déterminer l'incidence de la mutation sur cette conformation et ainsi d'objectiver les différences de migration sur un gel. Pour la SSCP, il n'existe pas de modèle informatique fiable, par conséquent, elle nécessite souvent de réaliser, de façon empirique, de nombreux essais avant d'obtenir les bonnes conditions opératoires pour un fragment donné. Cependant, certains auteurs ont décrit une modélisation informatique de cette technique portant sur la structure secondaire de l'ARN (Nielsen, Novoradovsky et al. 1995).

### **3.2.4 Le séquençage**

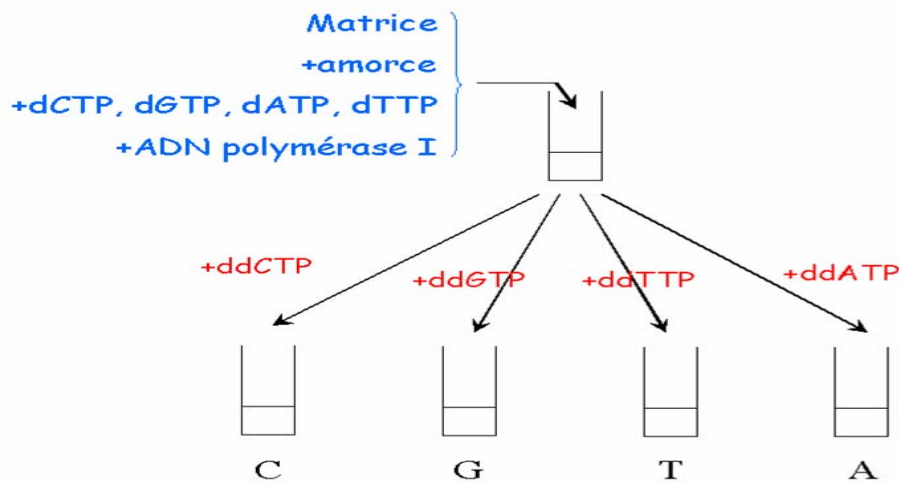
#### **3.2.4.1 Principe**

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un gène ou d'un fragment de gène. Il nécessite une amplification d'une portion du génome par PCR. Soit elle se fait directement sur l'ADN viral, soit elle nécessite une étape préalable de synthèse d'ADN complémentaire par la TI si le génome viral est de l'ARN. La méthode de séquençage actuellement employée est la méthode enzymatique de SANGER dite des didéoxynucléotides ou de terminaison de chaînes (Bogard M 1998). Elle consiste à synthétiser, à partir d'une amorce appariée à un simple brin, une collection de brins complémentaires marqués, dont les tailles diffèrent d'un nucléotide car les synthèses ont été interrompues par l'incorporation d'un didéoxynucléotide (ddNTP) à la place du désoxy nucléotide (dNTP) correspondant. Il s'agit d'une terminaison de chaîne, car il y a un 3'H à la place d'un 3'OH et que la polymérase ne peut pas synthétiser la liaison phosphodiester.

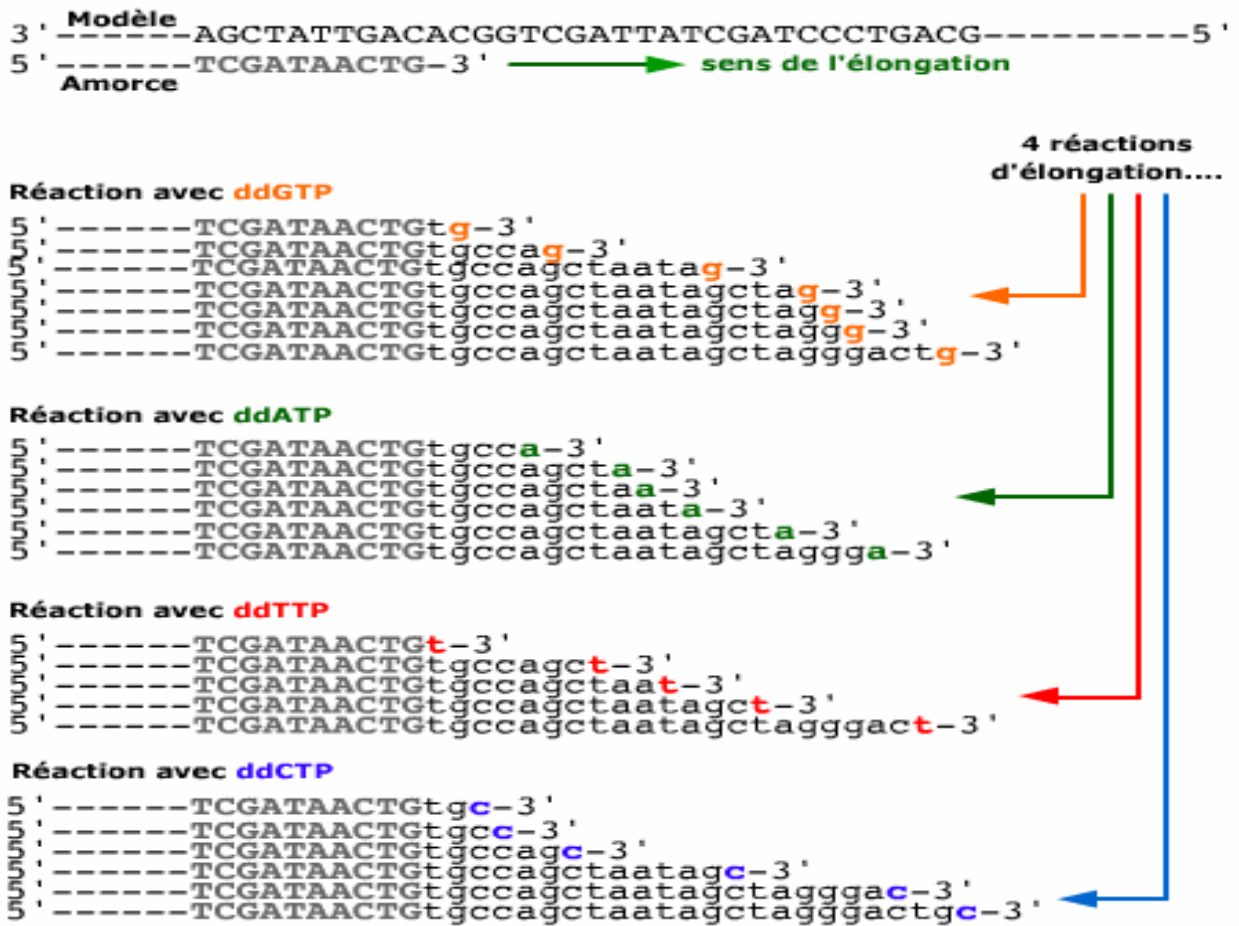


**Figure 9: Structure biochimique des dNTP et ddNTP**

La première étape consiste à hybrider le primer avec la matrice (simple brin) en 3' du fragment à séquencer. L'échantillon est séparé en quatre aliquots, dans 4 tubes dont la composition diffère par les didésoxynucléotides qu'ils contiennent.



Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100, il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP. Après adjonction de l'ADN polymérase, la réaction de synthèse se produit jusqu'à ce que par hasard, un didéoxynucléotides soit incorporé à la place d'un désoxynucléotide: l'élongation s'interrompt. Seule le brin d'ADN néosynthétisé contient des substrats marqués radioactivement ou chimiquement ; le produit peut donc être détecté et distingué de la matrice non marquée.

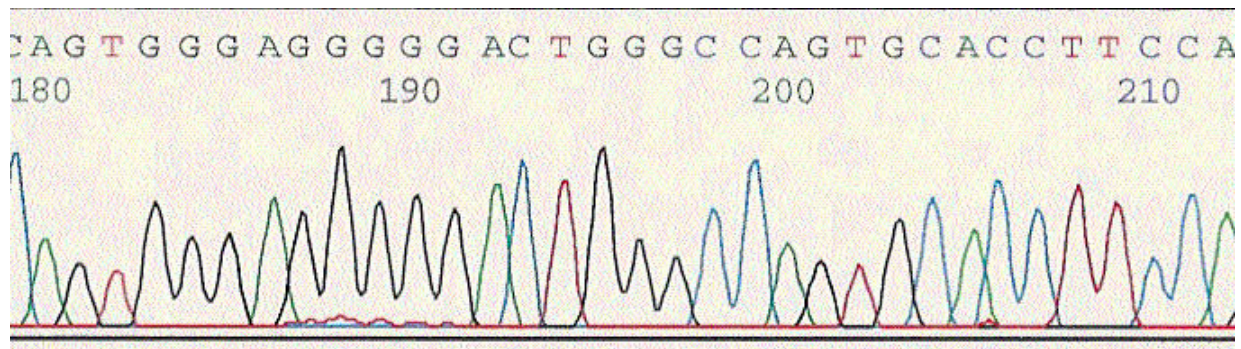


**Figure 10:** La technique de séquençage : mécanisme de l'élongation.

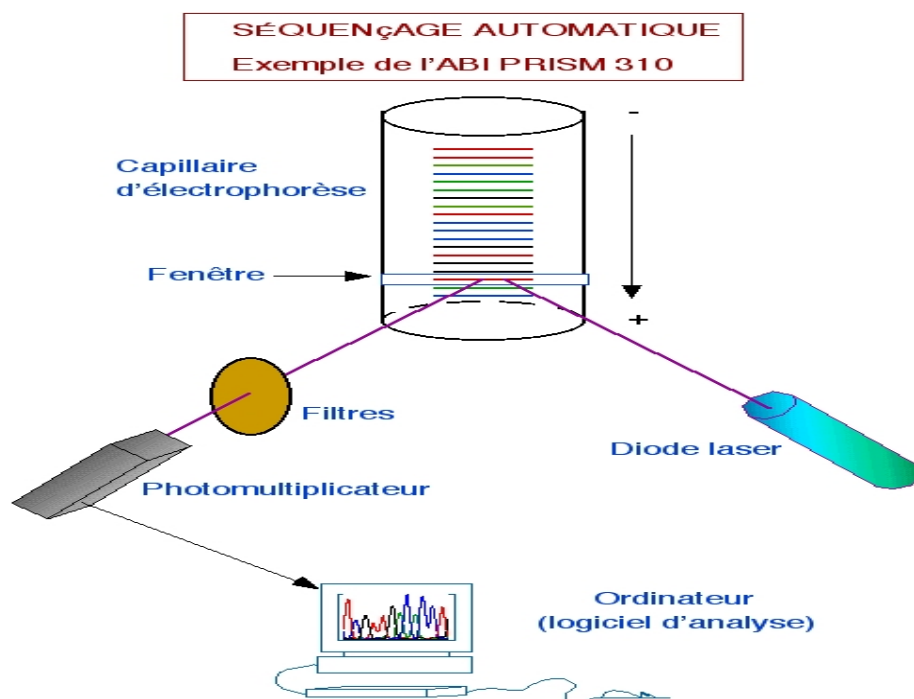
([www.inrp.fr/Access/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm](http://www.inrp.fr/Access/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm))

Cette collection de fragments subit une électrophorèse à haute résolution sur gel de polyacrylamide capable, après révélation, de distinguer des fragments dont la taille diffère d'une seule paire de base.

La technique automatisée se base sur le même principe à la différence près que chacun des 4 didéoxynucléotides est marqué par un fluorochrome spécifique ce qui permet de réaliser les 4 réactions dans un seul tube réactionnel. La séparation des brins se fait dans un tube capillaire rempli de résine et se réalise en continu ; chaque base émet un signal fluorescent spécifique après excitation par une cellule laser ; ces signaux sont analysés puis stockés sous forme de chromatogramme avec en abscisse le temps et en ordonnée l'intensité du signal. Chaque pic de couleur spécifique correspond à 1 base :



***Figure 11: Exemple de chromatogramme.***



***Figure 12: Analyse de séquence par technique automatique***

En général, une réaction de séquence est effectuée sur les 2 brins d'ADN (réaction sens et anti-sens) : ceci permet de contrôler la présence d'une mutation au niveau de l'ADN et donc de les différencier des erreurs effectuées par l'ADN polymérase utilisée lors de la réaction de séquence.

### **3.2.4.2 Avantages et inconvénients**

Le séquençage demeure la méthode la plus précise et fiable pour identifier les variants du VIH-1. Les séquences partielles *gag* et/ou *env* ainsi que l'analyse des séquences *pol* (TI et protéase) donnent des informations plus précises que le sérotypage ou le HMA ; en effet, les séquences virales complètes permettent d'établir si les nouveaux isolats sont recombinants ou appartiennent à un sous-type à part entière et ceci en analysant phylogénétiquement leurs liens aux autres séquences VIH-1 de référence. En complément, de nombreux logiciels informatiques ont été développés pour identifier les séquences mosaïques du virus. On peut ainsi obtenir, à partir d'une séquence partielle ou complète, une cartographie où la position des points de recombinaison entre les régions appartenant à différents sous-types est représentée. La détermination des sous-types par séquençage est la méthode la plus précise mais nécessite un équipement sophistiqué et onéreux.

Outre son intérêt majeur dans la surveillance globale de la variabilité génétique, le séquençage, et notamment celui des régions codant pour la TI et la protéase, a constitué une avancée importante dans l'étude des résistances du virus aux antirétroviraux ; cet aspect sera développé dans un paragraphe ultérieur.

## **4 Virus et résistance.**

### **4.1 Les antirétroviraux dirigés contre le VIH**

Pour produire de nouveaux virions, le VIH doit en permanence réinfecter de nouvelles cellules : c'est cette propriété qui le rend vulnérable aux antirétroviraux dont on constate aujourd'hui le succès en thérapeutique.

Les antirétroviraux actuellement disponibles pour inhiber la réplication virale agissent au niveau de 2 enzymes nécessaires à la réplication virale : la TI et la protéase. On distingue quatre classes d'antirétroviraux selon leurs propriétés moléculaires et leur cible : les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase

inverse (INNTI), les inhibiteurs de la protéase (IP) et, plus récemment, sont apparus les inhibiteurs de fusion (IF). L'utilisation de ces antirétroviraux en tri ou quadrithérapie a donné lieu à des résultats spectaculaires dans la thérapeutique de l'infection ; en effet, 70 à 90 % des patients recevant un traitement antirétroviral de première ligne atteindront l'objectif virologique qui est la suppression de la réplication pour aboutir à une charge virale plasmatique en ARN inférieure au seuil de détection. Par ailleurs, on observe sous traitement une véritable restauration immunitaire, appréciée par la remontée des lymphocytes CD4+.

**Tableau II: Molécules antirétrovirales utilisées dans le traitement du VIH**

<b>Inhibiteurs de la transcriptase inverse</b>	
<b>Analogues nucléosidiques</b>	zidovudine (AZT), <i>Rétrovir</i> ® didanosine (ddl), <i>Videx</i> ® lamivudine (3TC), <i>Epivir</i> ® stavudine (d4T), <i>Zerit</i> ® abacavir (ABC), <i>Ziagen</i> ® ddC zalcitabine, <i>Hivid</i> ® AZT+ 3TC: <i>Combivir</i> ® AZT+ 3TC+ABC: <i>Trizivir</i> ®
<b>Analogues non nucléosidiques</b>	Efavirenz, <i>Sustiva</i> ® Nevirapine, <i>Viramune</i> ® Delavirdine, <i>Rescriptor</i> ® (ATU)
<b>Inhibiteur nucléotidique</b>	Tenofovir, <i>Viread</i> ®
<b>Inhibiteurs de la protéase</b>	
	indinavir, <i>Crixivan</i> ® ritonavir, <i>Nordir</i> ® nelfinavir, <i>Viracept</i> ® saquinavir, <i>Invirase</i> ® <i>Fortovase</i> ® lopinavir/ritonavir, <i>Kaletra</i> ® amprenavir, <i>Agenerase</i> ® atazanavir (essai thérapeutique) tipranavir (essai thérapeutique)
<b>Inhibiteur de fusion</b>	
	T 20, <i>Fuzeon</i> ®

## **4.2 Résistance aux antirétroviraux : mécanismes**

Le haut pouvoir de réplication du virus, la faible fidélité de la TI associés au caractère persistant de l'infection provoque l'accumulation de mutations non létales pour le virus, dont certaines peuvent entraîner des modifications des enzymes cibles des thérapeutiques antivirales. Des mutants résistants préexistent avant toute mise en œuvre de traitement ; ces quasi-espèces minoritaires pourront émerger si la réplication n'est pas totalement supprimée et ce, par pression de sélection de la thérapeutique (Clavel, Race et al. 2000). C'est cette propriété qui justifie l'ensemble des stratégies thérapeutiques développées aujourd'hui dans le traitement de l'infection et qui repose sur le principe que toute inhibition insuffisante de la réplication virale chez les patients traités va conduire invariablement à la sélection de mutants résistants.

La résistance à ces antirétroviraux est la conséquence de mutations ou d'insertions présentes sur les gènes codant pour la TI et/ou la protéase. Ces mutations vont s'exprimer au niveau des protéines codées par ces gènes et entraîner la substitution de l'acide aminé normalement présent chez la souche sauvage par un autre acide aminé. Elles sont désignées par leur position dans la séquence protéique de l'enzyme cible, précédée de l'acide aminé spécifique de la souche de référence et suivie du ou des acides aminés substituants.

Les mutations entraînent des modifications de structure et de fonction des enzymes cibles : l'interaction avec les antirétroviraux correspondants est alors perturbée. Si les mutations uniques confèrent une forte résistance au traitement, la sélection est rapide ; le plus souvent, il s'agit d'une mutation existant avant même l'introduction du traitement ; c'est ce qu'on observe pour certains antirétroviraux comme la névirapine (NVP) ou la lamivudine (3TC). S'il faut plusieurs mutations pour obtenir un niveau suffisant de résistance vis à vis d'une molécule donnée, la sélection est lente et se produit par accumulation des mutations ; cette dernière est possible grâce à la persistance de la réplication ; c'est le cas pour la plupart des inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs de la protéase. On parle de barrière génétique plus importante pour les IP que pour la névirapine et la 3TC. Chez les

patients pour lesquels la succession de traitements n'a pas été efficace ou seulement très partiellement, les mutations de résistance du virus aux molécules antirétrovirales jouent un rôle prépondérant dans l'échec thérapeutique. La probabilité de sélection de virus résistants sous traitement dépend du niveau de réplication virale, de sa durée d'évolution et du type de molécules utilisées.

### **4.3 Les tests de mesure de résistance**

Depuis quelques années, de nombreuses publications ont documenté le rôle de la résistance dans les échecs virologiques et le pouvoir prédictif des mutations de résistance sur la réponse thérapeutique (Gilbert, Hanna et al. 2000) (Lorenzi, Opravil et al. 1999) (Van Vaerenbergh, Van Laethem et al. 2000).

Il existe 2 types de tests pour évaluer le niveau de résistance des virus aux antirétroviraux, les tests phénotypiques et génotypiques.

#### **4.3.1 Les tests phénotypiques**

##### **4.3.1.1 Principe**

Les tests phénotypiques permettent une mesure directe de la sensibilité des isolats aux antirétroviraux. Ce sont des techniques lourdes, longues et coûteuses ; elles mesurent la production virale sur culture cellulaire en utilisant des concentrations croissantes de la molécule à tester. On définit ainsi les concentrations inhibitrices 50% et 90% qui sont les concentrations d'antirétroviraux capables d'inhiber respectivement 50% et 90% de la réplication virale (CI50 et CI90). Les virus résistants présenteront une augmentation de ces valeurs par rapport à une souche sensible de référence. Classiquement, on met en coculture les lymphocytes du patient en présence de différentes concentrations de la molécule à tester. Une autre technique, la plus utilisée actuellement, est la RVA (Recombinant Virus Assay) : ce test a été décrit pour la première fois par Kellam et Larder en 1994 (Kellam and Larder 1994); son principe est l'obtention d'un virus recombinant à partir d'un virus de laboratoire et d'un fragment amplifié par PCR contenant le gène de la TI

ou de la protéase de la souche virale du patient ; ce virus recombinant est ensuite cultivé avec différents antirétroviraux en concentration variable. Ce test présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide que le précédent (7 jours).

#### **4.3.1.2 Indications**

Selon les recommandations du groupe d'expert du rapport 2004 concernant la prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH, les tests phénotypiques restent aujourd'hui un outil de recherche devant être utilisés uniquement dans la perspective de l'évaluation de nouvelles molécules (Delfraissy 2004). Ils permettent aussi d'apprécier la sensibilité à certains antirétroviraux dans des cas particuliers (Race 2001). Des études n'ont pas montré que les tests phénotypiques actuels apportaient un bénéfice à la prise en charge des patients en échec thérapeutique. (Delfraissy 2004).

### **4.3.2 Les tests génotypiques**

#### **4.3.2.1 Principe**

Les tests génotypiques, plus accessibles et de réalisation plus aisée, sont les plus largement utilisés. Ils constituent une approche indirecte en permettant de déterminer la présence de mutations, connues pour modifier la sensibilité du virus aux antirétroviraux sur le gène de la TI, de la protéase ou de la protéine de fusion. Le test le plus utilisé est le séquençage des gènes correspondants à ces enzymes, technique décrite plus haut pour la mise en évidence des sous-types (méthode de Sanger). L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne détecte pas les populations minoritaires lorsque celles-ci représentent moins de 20% de la population totale (D'Aquila 2000); les techniques de clonage moléculaire permettent d'abaisser ce pourcentage à 1 % mais n'analysent que quelques codons à la fois et restent pour l'instant du domaine de la recherche.

La technique LIPA (Line Probe Immunoassay) est une autre technique basée sur le principe de l'hybridation différentielle et limite l'analyse à certains codons spécifiques. En effet, l'ADN viral amplifié et biotinylé est hybridé avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de type « sauvages » ou « mutantes » immobilisées en ligne parallèle sur une bandelette. Ce test détecte bien les populations mixtes mais ne donne pas d'hybridation lorsqu'il existe un polymorphisme dans les régions proches du codon étudié (Brun-Vezinet 1999).

#### **4.3.2.2 Indications**

L'arrêté du 22 décembre 2004 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale, indique que les tests de résistance génotypiques sont limités aux personnes porteuses de l'infection par le VIH se trouvant dans les situations suivantes :

- initiation d'un traitement antirétroviral au cours de la primo-infection ou lors d'une infection récente
- changement de traitement motivé par un échec thérapeutique ; dans ce cadre, les tests doivent être prescrits alors que le patient reçoit encore le traitement que l'on envisage de changer.

Les recommandations du groupe d'experts du rapport 2004 ajoutent que ces tests peuvent être indiqués dans le cadre d'un traitement initial si une notion de résistance chez le patient source est connue. Le rapport précise par ailleurs, que toutes ces indications sont valables pour l'enfant et la femme enceinte pour lesquels il n'y a pas d'indications systématiques. Des études indiquent que les tests génotypiques apportent un bénéfice par rapport à la seule utilisation des données cliniques et thérapeutiques. Une réduction supplémentaire de la charge virale d'environ 0,6 log et une augmentation de 15 à 20 % du pourcentage de patients ayant une charge virale indétectable (200 à 500 copies/ml) sont observées après 3 à 6 mois de traitement dans le bras avec utilisation de tests génotypiques par rapport au bras contrôle (choix non guidé par le génotype). (Delfraissy 2004)

### 4.3.2.3 Interprétation des tests de résistance génotypique

L'interprétation des mutations associées à la résistance aux antirétroviraux nécessite un rapport d'expertise long et difficile à établir. Pour chaque classe thérapeutique un algorithme d'interprétation a été établi par le groupe Résistance de l'ANRS (Tableaux III, IV et V ; **version juillet 2005**)

(Ref: <http://www.hivfrenchresistance.org>)

**Tableau III : Algorithme d'interprétation des mutations associées aux résistances aux inhibiteurs non nucléosidiques de la TI**

	Mutations associées à une résistance
<b>EFV</b>	- L100I - K101E - K103H/N/S/T - V106M - Y181C/I - Y188C/L - G190A/C/E/Q/S/T/V - P225H - M230L
<b>NVP</b>	- L100I - K101E - K103H/N/S/T - V106A/M - Y181C/I - Y188C/H/L - G190A/C/E/Q/S/T/V - M230L

**EFV: efavirenz, NVP: nevirapine**

**Mutations associées aux traitements antirétroviraux mais de signification indéterminée:  
K101H/N/P/Q**

**Tableau IV : Algorithme d'interprétation des mutations associées aux résistances aux inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI**

	<b>Mutations associées à une résistance</b>	<b>Mutations associées à une résistance possible</b>
<b>ZDV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- T215Y/F</li> <li>- Au moins 3 mutations parmi : M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E</li> <li>- Q151M</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	- T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
<b>3TC/FTC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M184V/I</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- K65R</li> <li>- Q151M</li> </ul>
<b>ddI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- At least a score of + 2 among: M41L + T69D + L74V + T215Y/F + K219Q/E – K70R – M184V/I</li> <li>- L74V sans aucune des mutations suivantes : M41L, T69D, K70R, M184V/I, T215Y/F, K219Q/E</li> <li>- Q151M</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- K65R</li> <li>- L74V</li> </ul>
<b>d4T</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- V75M/S/A/T</li> <li>- T215Y/F</li> <li>- Au moins 3 mutations parmi: M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E</li> <li>- Q151M</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	- T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
<b>ABC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Au moins 5 mutations parmi: M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F</li> <li>- K65R and L74V and Y115F and M184V/I</li> <li>- Q151M</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 mutations parmi : M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F</li> <li>- K65R</li> </ul>
<b>TDF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Au moins 6 mutations parmi: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V, L210W, T215Y/F</li> <li>- K65R</li> <li>- Insertion au codon 69</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3, 4 ou 5 mutations parmi : M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V, L210W, T215Y/F</li> </ul>

**TAMs = M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E**

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

**Mutations associées aux traitements antirétroviraux mais de signification indéterminée: E44A, D67E/G, T69A, L74I, K219N/R**

**Tableau V : Algorithme d'interprétation des mutations associées aux résistances aux inhibiteurs de la protéase.**

	<b>Mutations associées à une résistance</b>	<b>Mutations associées à une résistance possible</b>
<b>IDV</b>	- M46I/L - V82A/F/M/S/T - I84A/V - L90M et au moins 2 mutations parmi : K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I	- L90M
<b>SQV/RTV 800/100 mg BID</b>	- G48V - Au moins 2 mutations parmi: L24I, I62V, V82A/F/T/S, I84V, L90M	
<b>NFV</b>	- D30N - I84A/V - N88S/D - L90M	- V82A/F/S/T et au moins 2 mutations parmi: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
<b>fosAPV/RTV 700/100 mg BID</b>	- I50V - Au moins 6 mutations parmi: L10F/I/V, K20M/R, E35D, R41K, I54V, L63P, V82A/F/S/T, I84V - V32I and I47V	
<b>LPV/r</b>	- Au moins 8 mutations parmi : 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 - V32I and I47A	- 6 ou 7 mutations parmi : 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
<b>ATV/RTV 300/100 mg QD</b>	- I50L - Au moins 3 mutations parmi : L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, I84V, I85V, L90M	
<b>TPV/RTV 500/200 mg BID</b>	- Au moins 8 mutations parmi : L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T, M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V - L33F/I and V82F/L/T and I84V	

**IDV: indinavir, SQV: saquinavir, NFV: nelfinavir, RTV: ritonavir, fosAPV: fosamprenavir, LPV: lopinavir, ATV:atazanavir, TPV: tipranavir. Mutations associées aux traitements antirétroviraux mais de signification indéterminée: K20T, M46V**

Ces algorithmes, remis à jour régulièrement sur la base d'études cliniques, déduisent, à partir des différentes associations de mutations de résistance (profil génotypique), les antirétroviraux pouvant être actifs. Des logiciels ayant intégrés les règles d'interprétation expriment les résultats, pour chaque molécule, avec la mention «résistance » ou « résistance possible ».

La complexité de certaines situations d'échec requiert la constitution d'un groupe transversal de cliniciens, virologues, pharmaciens au sein des CISIH afin d'interpréter ces tests et les intégrer dans la prise en charge thérapeutique globale du patient.

#### **4.4 Mutations associées à la résistance aux antirétroviraux chez les patients traités.**

##### **4.4.1 Les mutations associées à une résistance aux INTI.**

Deux grands mécanismes de résistance aux INTI ont été décrits :

- le phénomène de discrimination implique une incorporation plus importante des nucléotides naturels par rapport aux nucléotides artificiels ; ainsi, l'élongation de la chaîne d'ADN pourra reprendre malgré la présence du médicament.

- le deuxième mécanisme appelé phénomène de pyrophosphorolyse ou d'excision, entraîne le retrait du dernier INTI incorporé, permettant aussi la reprise de l'élongation. (Arion, Kaushik et al. 1998; Meyer, Matsuura et al. 1998; Meyer, Matsuura et al. 1999; Arion, Sluis-Cremer et al. 2000)

Les mutations concernées diffèrent selon le type de mécanisme incriminé : ainsi le phénomène de discrimination concerne principalement les mutations K65R, L74V, Q151M et M184V tandis que celui d'excision fait notamment intervenir les mutations sélectionnées par les analogues de la thymidine (zidovudine, stavudine) appelés TAMs (thymidine analogue mutations) : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Ces 6 mutations, ainsi que la Q151M furent les premières reconnues comme impliquées dans la résistance à la zidovudine, la K70R étant sélectionnée en premier. Les TAMs interviennent dans la résistance à

tous les INTI exceptée la 3TC. Elles diminuent la stabilité de la chaîne d'ADN en cours d'élongation en ralentissant le fonctionnement de la TI favorisant ainsi l'excision du dernier nucléotide ; cette résistance est croisée entre les INTI et ce, à des degrés divers. Deux profils distincts de TAMs ont été observés : le premier regroupe les mutations M41L, L210W, et T215Y, le deuxième les mutations D67N, K70R, T215F et K219Q/E. Le 1<sup>er</sup> profil dont les capacités répliquatives sont plus importantes, est deux fois plus fréquemment sélectionné et est associé à des hauts niveaux de résistance à la plupart des INTI. Des niveaux de résistance plus faibles sont associés au 2<sup>ème</sup> profil (Calvez, Marcelin et al. 2004).

Certaines mutations, malgré le haut pouvoir de résistance qu'elles confèrent, pourraient avoir un rôle bénéfique : c'est le cas de la M184V/I, mutation proche du site actif de la TI et qui gêne l'entrée de certains INTI sans entraver le fonctionnement de l'enzyme (Sarafianos, Das et al. 1999). Elle est sélectionnée dans quasiment 100% des cas en quelques semaines de monothérapie de 3TC (Eron, Benoit et al. 1995). Les données de l'essai prospectif de type soustractif CAESAR suggèrent une activité antivirale in vivo résiduelle de la 3TC en présence de la 184, ainsi qu'un effet délétère de celle-ci sur la capacité répliquative du virus (Campbell, Young et al. 2003). Une autre étude a montré que cette mutation resensibiliserait une TI rendue résistante à la zidovudine par le biais d'une autre mutation, la T215Y (Masquelier, Descamps et al. 1999).

En pratique, les médicaments antirétroviraux ne sont jamais utilisés en monothérapie ; la mise en place de tri ou quadrithérapie modifie la fréquence et le type de mutation que l'on observe en monothérapie. Ceci est dû aux interactions existantes entre les mutations : par exemple, la sélection de la M184V/I retarde l'apparition des TAMs quand on associe un analogue de la thymidine avec la 3TC chez les patients naïfs en échec virologique.

L'insertion d'un codon en position 69 est responsable d'un bas niveau de résistance aux INTI si elle est seule et d'un haut niveau de résistance dès lors que les TAMs lui sont associées, excepté pour la 3TC. Les mécanismes de résistance de ces insertions semblent être liés à l'augmentation des deux mécanismes

impliqués dans la résistance aux INTI. La mutation Q151M confère un niveau de résistance moyen (4 à 10 fois la CI50) aux INTI dont la ZDV, la ddL, la d4T et l'ABC lorsqu'elle est isolée. Par contre, lorsqu'elle est associée à d'autres mutations (codons 62, 75, 77 et 116), elle forme un complexe de multirésistance conférant un haut niveau de résistance à ces molécules ainsi qu'à la 3TC (Calvez, Marcelin et al. 2004).

#### **4.4.2 Mutations associées à une résistance aux INNTI**

Ces molécules se fixent au niveau de la poche hydrophobe de la TI entraînant ainsi son blocage (Tantillo, Ding et al. 1994). La barrière génétique de ces molécules est basse car une seule mutation à ce niveau entraîne une résistance de haut niveau à l'INNTI et à l'ensemble de la classe pour la plupart des mutations. Une monothérapie par INNTI entraîne une émergence rapide de ces mutations du fait de leur probable préexistence au sein des quasi-espèces de patients naïfs de tout traitement (Richman, Shih et al. 1991; Havlir, Eastman et al. 1996).

#### **4.4.3 Mutations associées à une résistance aux IP**

Le mécanisme moléculaire de la résistance du virus aux IP correspond à une modification de la conformation du site actif de l'enzyme liée aux mutations situées à proximité (codons 82, 84) ou à distance de celui-ci (codons 36, 46, ou 71). Les mutations dites primaires, généralement proches du site actif, sont les premières sélectionnées lors d'un échappement. La plupart de ces mutations entraîne une résistance aux IP mais provoque en contrepartie une diminution du pouvoir répliatif du virus (Croteau, Doyon et al. 1997) (Pazhanisamy, Stuver et al. 1996); les mutations plus éloignées, dites secondaires, viendront s'accumuler progressivement et lentement sous la pression de sélection des IP afin de renforcer la résistance. D'autres mutations sont observées sur le gène de la protéase n'entraînant pas d'action directe de résistance et considérées comme polymorphiques car présentes dans des proportions variables chez des patients

n'ayant jamais reçu d'IP ; certaines études ont montré que ces mutations pouvaient améliorer les performances répliquatives du virus comme pour la mutation L63P (Martinez-Picado, Savara et al. 1999).

Des résistances croisées à tous les IP sont observées lorsque 2 mutations ou plus sont présentes au niveau du site actif de l'enzyme : ce sont les mutations D30N, G48V, I50V, V82A/F/S/T, I84V, L90M.

#### **4.5 Les mutations associées à la résistance aux antirétroviraux chez les patients non traités.**

Des mutations de résistance sur les gènes de la protéase et de la TI (autres que celles considérées comme polymorphiques) ont été observées chez des patients naïfs de tout traitement. Ces mutations peuvent résulter de la transmission de virus mutés à la suite d'une ou plusieurs lignes de traitement prescrites chez le patient source. En effet, ces 10 dernières années, de nombreux cas de transmission de virus résistants appartenant au sous-type B ont été décrits chez des patients nouvellement infectés (Boden, Hurley et al. 1999) (Brodine, Shaffer et al. 1999) (Erice, Mayers et al. 1993) (Little, Daar et al. 1999) (Yerly, Kaiser et al. 1999)). Peu d'études ont été faites sur la transmission de mutations de résistance des virus appartenant au sous-type non B.

Dans la 1<sup>ère</sup> partie de cette thèse, nous verrons les conséquences de la variabilité génétique du virus sur la technique de séquençage à travers le génotypage de souches virales VIH-1 de type J.

Dans une 2<sup>ème</sup> partie, nous étudierons une cohorte de patients suivis au CISIH de Nantes dont la souche virale appartient au sous-type non B. Après description de cette population, nous étudierons le polymorphisme existant sur les séquences correspondant à la protéase et à la TI des patients naïfs de tout traitement et ce, afin d'observer ou non la présence de mutations de résistance.

**1ère partie : Interférences analytiques des  
souches virales de type non B avec la  
technique de séquençage :  
exemple du sous-type J.**

## **Matériels et méthodes**

# 1 Les patients

Afin d'illustrer l'impact de la variabilité génétique du VIH sur les étapes d'amplification de l'ARN, une étude rétrospective a été effectuée au sein du laboratoire: nous avons évalué le pourcentage d'amplification obtenu sur la TI et la protéase en fonction de la charge virale pour les sous-types non B puis pour les sous-types B. Les résultats sont regroupés dans les tableaux VI et VII.

**Tableau VI: Sous-type non B : pourcentage d'amplification obtenu sur la TI et la protéase en fonction de la charge virale**

Nombre d'échantillons	Charge virale	TI	PROTEASE
n=23	<200	43%	65%
n=12	200-1000	50%	77%
n=23	1000-5000	52%	100%
n=10	5000-10000	50%	100%
n=24	>10000	92%	100%
N=92			

*(Etude effectuée sur 92 échantillons au cours des années 2002, 2003 et 2004)*

**Tableau VII: Sous-type B : pourcentage d'amplification obtenu sur la TI et la protéase en fonction de la charge virale**

Nombre d'échantillons	Charge virale	TI	PROTEASE
n=102	<200	19%	35%
n=77	200-1000	60%	77%
n=97	1000-5000	87%	96%
n=49	5000-10000	96%	100%
n=239	>10000	98%	100%
N=564			

*(Etude effectuée sur 564 échantillons au cours des années 2002, 2003 et 2004)*

Par ailleurs, depuis la mise en place en 1999 de la technique de séquençage au laboratoire, il est apparu que, pour certains échantillons, l'amplification du gène de la TI n'était pas réalisable : c'est le cas par exemple de tous les patients dont la souche virale appartient au sous-type J. L'hypothèse d'un manque de spécificité des amorces a été posée ; en effet, les amorces utilisées en routine lors de l'étape d'amplification de l'ARN sont élaborées à partir de la séquence de référence du sous-type B et ne prennent donc pas en compte la diversité génétique des souches non B. Le but de cette étude est d'amplifier la région codante pour la TI des souches virales de type J en testant de nouvelles amorces, plus spécifiques de ce dernier. Pour cela, nous avons établi un groupe d'étude comprenant des patients disposant d'échantillons en plasmathèque et dont la souche virale appartient au sous-type J. Afin d'obtenir un maximum d'échantillons, nous avons pris en compte les patients suivis au CHU de Nantes, d'Angers mais aussi ceux des centres hospitaliers de St Nazaire, la Roche sur Yon et du Mans.

En 2000, la classification des souches dans le sous-type J a été faite après analyse phylogénétique de la séquence correspondante à la protéase en utilisant les banques de données de l'époque. En 2004, alors que ces banques ont été progressivement réactualisées et complétées par de nouvelles formes recombinantes, il s'est avéré que la plupart des souches de type J décrites initialement étaient reclassées en formes recombinantes de type CRF11. Nous verrons par la suite, l'impact de ce remaniement sur le choix des amorces.

## **2 Les prélèvements**

Nous travaillons sur des échantillons de plasma conservés en plasmathèque à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les prélèvements ont été effectués sur anticoagulant EDTA dans le cadre d'une prescription de charge virale et/ou d'un génotypage. Les tubes EDTA ont été acheminés au centre de tri des laboratoires du CHU de Nantes puis centrifugés à 2000g (centrifugeuse Jouan) pendant 10 mn afin que le plasma soit décanté puis congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans la plasmathèque et ceci, au maximum 2 heures après le

prélèvement. Le laboratoire de virologie de Nantes conserve un aliquot de plasma de tout patient ayant eu ce type d'examen depuis mars 1997. Ces plasmas ont subi une étape d'extraction afin d'obtenir l'ARN du virus. Pour tous les échantillons étudiés, une charge virale avait été prescrite ; les résultats de ces dernières ont pu être récupérés dans les archives du logiciel Netlab.

### **3 Technique de séquençage adaptée aux souches virales de type B**

#### **3.1 Extraction**

Deux techniques peuvent être utilisées pour extraire l'ARN à amplifier et à séquencer ; elles sont réalisées en zone 2 du secteur de préamplification du laboratoire :

- une technique manuelle utilisant le kit Nucléospin® RNA Virus du laboratoire Macherey-Nagel. Elle nécessite environ 150 µl de plasma.
- une technique automatique, plus sensible, utilisant le kit Nuclisens EasyQ® du laboratoire Biomérieux et l'extracteur automatique Nuclisens™ Extractor du même laboratoire. Elle nécessite une quantité de plasma plus importante (environ 1ml) mais permet un meilleur rendement d'extraction pour des échantillons dont la charge virale est basse.

##### **3.1.1 Technique manuelle**

Le kit Nucléospin ® RNA virus contient un réactif de lyse (RAV 1) permettant une lyse rapide des virus à ARN. Ce réactif est aliquoté et conservé à -20 °C.

Le tampon de lyse, associé à l'éthanol, crée des conditions appropriées à la fixation des acides nucléiques à la membrane de silice dans les colonnes Nucléospin® RNA virus. Les contaminants, inhibiteurs potentiels de la PCR (sels, métabolites...) sont éliminés par des étapes de lavages par des tampons éthanoliques RAW et RAV 3. Les acides nucléiques sont élués grâce à des

tampons ou de l'eau (Rnase Free Water). Les différentes étapes de la technique sont décrites dans le tableau ci-après. Les éluats sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tableau VIII: Les différentes étapes de la technique d'extraction manuelle (laboratoire Macherey Nagel)**

<b><u>Extraction de l'Acide Nucléique</u></b>	<b>Décrystalliser les aliquots de tampon RAV1</b> 5' maximum à $56^{\circ}\text{C}$ en agitant régulièrement
	<b>Ajouter 150 <math>\mu\text{l}</math> de prélèvement</b> <b>150 <math>\mu\text{l}</math> de PBS</b> pour le témoin d'extraction
	Vortexer 10'' à 15''.
	<b>Incuber 5' à <math>56^{\circ}\text{C}</math>,</b> <b>centrifuger 1' à 10 000tr/mn</b> pour faire retomber la totalité du liquide.
<b><u>Fixation de l'Acide Nucléique sur la colonne</u></b>	Ajouter <b>600 <math>\mu\text{l}</math> d'éthanol absolu</b> Mélanger avec le cône et transférer sur la colonne correspondante attendre la fin de la filtration.
<b><u>Lavages</u></b>	Ajouter <b>500 <math>\mu\text{l}</math> de tampon RAW</b> attendre la fin de la filtration.
	Ajouter <b>600 <math>\mu\text{l}</math> de tampon RAV3</b> attendre la fin de la filtration, puis <b>200 <math>\mu\text{l}</math> de tampon RAV3</b> à nouveau
	Fermer l'eau et mettre la colonne dans un tube collecteur
	<b>Centrifuger 2' à 5' à 14 000 tr/min</b>
<b><u>Elution de l'Acide nucléique</u></b>	Jeter le tube collecteur Insérer la colonne dans un tube Eppendorf Incuber 3mn à $56^{\circ}\text{C}$ pour évaporer l'alcool
	Ajouter : <b>50 <math>\mu\text{l}</math> de RNase Free Water</b> préchauffée à $56^{\circ}\text{C}$ , si extraction d'ARN <b>laisser en contact 1' à 2' à température ambiante</b>
	<b>Centrifuger 1' à 14000 tr/min</b>
	Jeter la colonne et conserver l'éluat à <b><math>-20^{\circ}\text{C}</math></b>
<b><u>Nettoyage de l'appareil</u></b>	Rincer l'appareil à l'eau et à l'eau de Javel diluée , rincer et égoutter. vider la poubelle dans le récipient des déchets cyanurés

### **3.1.2 Technique automatique**

Le Nuclisens Extractor est un automate permettant l'isolement et la purification des acides nucléiques à partir d'un échantillon biologique. Le principe de l'extraction repose sur l'utilisation de la silice selon le procédé décrit par Boom; 1 ml de plasma centrifugé du patient est mélangé à 9 ml de tampon de lyse ; 50µl de silice sont alors ajoutés : le mélange est placé dans des cartouches ou « boomettes » qui sont ensuite placées sur l'extracteur automatique. L'extraction dure environ 45 minutes : tout d'abord, le thiocyanate de guanidium, agent chaotropique, libère les acides nucléiques qui sont ensuite précipités par l'action de l'éthanol à 70° ; ce composé permet de désactiver les enzymes comme les nucléases contenues dans l'échantillon. Les acides nucléiques se fixent alors sur la silice. La silice et les acides nucléiques fixés sont retenus par des filtres contenus dans les boomettes. Une purification par l'acétone est réalisée afin d'éliminer les protéines et autres substances potentiellement inhibitrices des réactions d'amplification. La dernière étape est l'élution à l'aide d'un tampon qui désolidarise les acides nucléiques de la silice. Le volume de l'éluat varie de 25 à 50 µl. Il est conservé à -80°C.

## **3.2 Amplification de l'ARN plasmatique**

### **3.2.1 Choix des amorces**

L'extrait à amplifier est de l'ARN, cela nécessite une étape préalable de rétrotranscription de cet ARN en ADN (RT PCR). La RT PCR est suivie d'une 2ème amplification génique appelée PCR nichée (Nested PCR). Elle consiste à amplifier un fragment d'ADN plus petit situé à l'intérieur des fragments qui ont été amplifiés lors de la 1<sup>ère</sup> étape.

L'amplification concerne les séquences codant pour les 2 enzymes cibles de la répllication virale : la protéase et la TI. Le choix des amorces a été fait en fonction de la séquence consensus du sous-type B décrite ci-après (figure 13). Les amorces utilisées pour les réactions d'amplification et de séquence sont regroupées dans le

tableau IX. Elles ont été élaborées selon les recommandations du groupe résistance AC 11 par le laboratoire Eurogentec. La base de données Genbank disponible sur internet nous a permis de vérifier les séquences de ces amorces.

**Tableau IX: Amorces utilisées pour les réactions d'amplification et de séquence**

Nom des amorces	Séquences des amorces 5'-3'	Position sur le génome	Séquence
<b>MJ-3</b>	5'-3' AGTAGGACCTACACCTGTCA	<b>2026-2045</b>	<b>TI</b>
<b>MJ-4</b>	5'-3' CTGTTAGTGCTTTGGTTCCTCT	<b>2945-2966</b>	<b>TI</b>
<b>A35</b>	5'-3' TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATT	<b>2076-2110</b>	<b>TI</b>
<b>NE135</b>	5'-3' CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT	<b>2846-2880</b>	<b>TI</b>
<b>SQ1</b>	5'-3' GCATATTTTTTCAGTTCCTTAG	<b>2889-2910</b>	<b>TI</b>
<b>SQ2</b>	5'-3' CTAAGGGAAGTGAATAATATGC	<b>2889-2910</b>	<b>TI</b>
<b>5' PROT1</b>	5'-3' TAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC	<b>1628-1651</b>	<b>Protéase</b>
<b>3' PROT1</b>	5'-3' GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCAGG	<b>2249-2280</b>	<b>Protéase</b>
<b>5' PROT2</b>	5'-3' TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCA	<b>1682-1709</b>	<b>Protéase</b>
<b>3' PROT2</b>	5'-3' AATGCTTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGC	<b>2167-2196</b>	<b>Protéase</b>

Les 2 couples d'amorces MJ3/MJ4 et A35/NE135 encadrent la région codant pour la TI et sont utilisées respectivement lors de la RT PCR et de la PCR nichée. Les couples d'amorces utilisés pour amplifier la région codante pour la protéase sont 5'PROT1/3'PROT1 pour la RT PCR et 5'PROT2/3'PROT2 pour la PCR nichée. Les amorces SQ1 et SQ2 seront utilisées lors de la réaction de séquence ; leur intérêt sera détaillé dans le paragraphe 3.2.5. La figure 13 montre les régions de fixation des différentes amorces sur la séquence de référence du VIH-1, sous-type B (U21135) (LosAlamosNationalLaboratory 2005).

1621 gacaggetaa ttttttaggg aagatctggc ctctctacaa gggaaggcca gggaatttc  
**5'Prot 1**  
1681 ttcagagcag accagagcca acagcccccac cagaagagag cttcaggtct ggggtagaga  
**3'Prot 1**  
1741 caacaactcc ccctcagaag caggagccga tagacaagga actgtatcct ttaacttc  
1799 cc tcaggtcaact ctttggcaac gaccctcgt cacaataaag ataggggggc aactaaagga  
1861 agctctatta gatacaggag cagatgatac agtattagaa gaaatgagtt tgccaggaag  
1921 atggaaacca aaaatgatag ggggaattgg aggttttacc aaagtaagac agtatgatca  
1981 gatactcata gaaatctgtg gacataaagc tataggtaca gtattagtag gacctacacc  
**MJ3**  
2041 tgcaacata attggaagaa atctgttgac tcagattggt tgcaetttaa atttt  
**A35**  
2096 cccat tagccctatt gagactgtac cagtaaaatt aaagccagga atggatggcc caaaagttaa  
2161 acaatgcca ttgacagaag aaaaaataaa agcattagta gaaatttga cagagatgga  
**3' Prot 2**  
2221 aaaggaagg aaaattcaa aaattgggce tgaaaatcca tacaatactc cagtattgc  
**5' Prot 2**  
2281 cataaagaaa aaagacagta ctaaattggag aaaattagta gatttcagag aacttaataa  
2341 gagaactcaa gactctggg aagtcaatt aggaatacca catcccgcag ggftaaaaaa  
2401 gaaaaaatca gtaacagtac tggatgtggg tgatgcatat ttttcagttc ccttagatga  
**SQ1 SQ2**  
2461 agacttcagg aagtatactg catttaccat acctagtata aacaatgaga caccagggat  
2521 tagatatcag tacaatgtgc ttccacaggg atggaaagga tcaccagcaa tattccaaag  
2581 tagcatgaca aaaatcttag agccttttag aaaacaaaat ccagacatag ttatctatca  
2641 atacatggat gatttgtatg taggatctga cttagaaata gggcagcata gaacaaaaat  
2701 agaggagctg agacaacatc tgttgaggtg gggacttacc acaccagaca aaaaacatca  
2761 gaaagaacct ccattccttt ggatgggta tgaactccat cctgataaat ggacagtaca  
2821 gcctatagtg ctgccagaaa aagacagctg gactgtcaat gacatacaga agttagtggg  
**NE 135**  
2881 gaaattgaat tggcaagtc agatttacc agggattaaa gtaaggcaat tatgtaaact  
2941 ccttagagga accaaagcac taacagaagt aataccacta acagaagaag cagagctaga  
**MJ4**

**Figure 13:** Séquence de référence (U21135) du VIH-1, sous-type B.

### 3.2.2 Etapes d'amplification

Pour la RT PCR, nous avons utilisé le kit Access proméga®. Il contient une AMV reverse transcriptase (*avium myeloblastis virus*) et une Tfl DNA polymérase (*thermus flavus*).

Les mélanges réactionnels, décrits dans le tableau X, sont les mêmes pour la TI et la protéase ; seules les amorces utilisées changent. Les milieux réactionnels (mix) sont préparés et aliquotés dans la zone 1 du secteur de pré amplification. Les extraits d'ARN sont ajoutés en dernier dans la zone 2 du secteur de pré amplification. Les microtubes sont alors placés dans le thermocycleur PTC 100 à effet Peltier de la firme MJ Research, INC.

Les programmes préenregistrés sur l'appareil sont décrits dans les tableaux XI et XII.

**Tableau X : Mélange réactionnel de la RT PCR (un tube)**

	<i>Quantité ajoutée en <math>\mu</math>l</i>	<i>Concentration finale</i>
eau distillée	10	
Buffer 5X	5	1X
MgSO4 25mM	2	2mM
5'P1 (prot) ou MJ-3 (TI) 20 $\mu$ M	0.625	0.5 $\mu$ M
3'P1 (prot) ou MJ-4 (TI) 20 $\mu$ M	0.625	0.5 $\mu$ M
dNTP 10mM	0.5	0.2mM
T4 Gene 32	0.25	
AMV Reverse transcriptase	0.5	
Tfl DNA Polymérase	0.5	
RNA	5	

**Tableau XI: Programme de la RT PCR sur thermocycleur PTC 100 – Protéase**

<i>Température en <math>^{\circ}</math>C</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Opération effectuée</i>
42	45 minutes	1 cycle	Reverse transcription
94	2 minutes		Première dénaturation
94	30 secondes	40 cycles	Dénaturation
55	30 secondes		hybridation
68	1 minute		élongation
68	10 minutes	1 cycle	dernière élongation
4	hold		refroidissement

**Tableau XII: Programme de la RT PCR sur thermocycleur PTC 100 – TI**

<i>Température en <math>^{\circ}</math>C</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Opération effectuée</i>
48	45 minutes	1 cycle	Reverse transcription
94	2 minutes		Première dénaturation
94	30 secondes	40 cycles	Dénaturation
59	30 secondes		hybridation
68	1 minute		élongation
68	10 minutes	1 cycle	dernière élongation
4	hold		refroidissement

Le kit de Perkin Elmer Applied Biosystems et une Taq DNA polymérase de chez Proméga ont été utilisés pour la PCR nichée. En pratique, nous transférons 5 µl du produit de RT PCR dans le mélange décrit dans le tableau XIII. Les microtubes sont alors placés dans le thermocycleur PTC 100. Les programmes préenregistrés sur l'appareil sont décrits dans les tableaux XIV et XV.

**Tableau XIII: Mélange réactionnel de la PCR nichée (quantité nécessaire pour un tube)**

	<i>Quantité ajoutée en µl</i>	<i>Concentration finale</i>
Buffer 10X PE	2.5	
MgCl <sub>2</sub> (25mM) PE	2	2 mM
dNTP (2.5 mM chacun)	2	0.2 mM
A20 ou 5'Prot2 (20 µM)	0.625	0.5 µM
NEI20 ou 3'Prot2 (20 µM)	0.625	0.5 µM
eau qsp 25 µl	12	
Taq Promega	0.25	
Produit de RTPCR	5	

**Tableau XIV: Programme de la PCR nichée sur thermocycleur PTC 100 – Protéase**

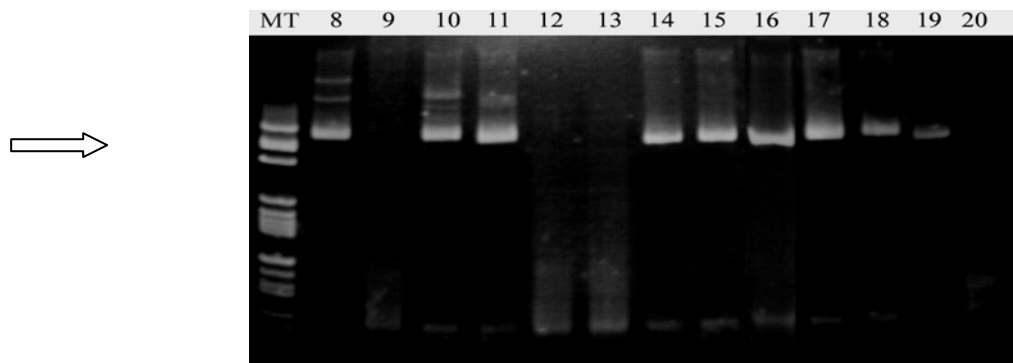
<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Opération effectuée</i>
94	5 minutes	1 cycle	Première dénaturation
94	30 secondes	35 cycles	dénaturation
50	30 secondes		hybridation
72	1 minute		élongation
72	10 minutes	1 cycle	dernière élongation
4	hold		refroidissement

**Tableau XV: Programme de la PCR nichée sur thermocycleur PTC 100 – RT**

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Opération effectuée</i>
94	5 minutes	1 cycle	Première dénaturation
94	30 secondes	35 cycles	dénaturation
64	30 secondes		hybridation
72	1 minute		élongation
72	10 minutes	1 cycle	dernière élongation
4	hold		refroidissement

### 3.2.3 Migration électrophorétique des produits de PCR nichée

Le but de cette étape est d'observer s'il y a eu ou non amplification et d'évaluer les quantités d'ADN obtenues en fonction de l'intensité du signal. Un gel à base de polyacrylamide est préparé extemporanément en mélangeant 10 ml d'acrylamide à 9% à 100 µl de persulfate d'ammonium et à 10 µl de TEMED. Sur le même gel, nous faisons migrer 3 µl de produit de PCR auquel nous avons ajouté 3 µl de bleu de bromophénol qui permettra la révélation des fragments d'ARN amplifiés sous lumière ultra violette. En parallèle, le marqueur de taille Roche (n°5 pour la protéase et n°6 pour la TI) est utilisé : il contient des fragments d'ADN de tailles connues et permettra d'évaluer la longueur des fragments amplifiés (figure 14).



***Figure 14: Migration électrophorétique des produits de PCR nichée.***

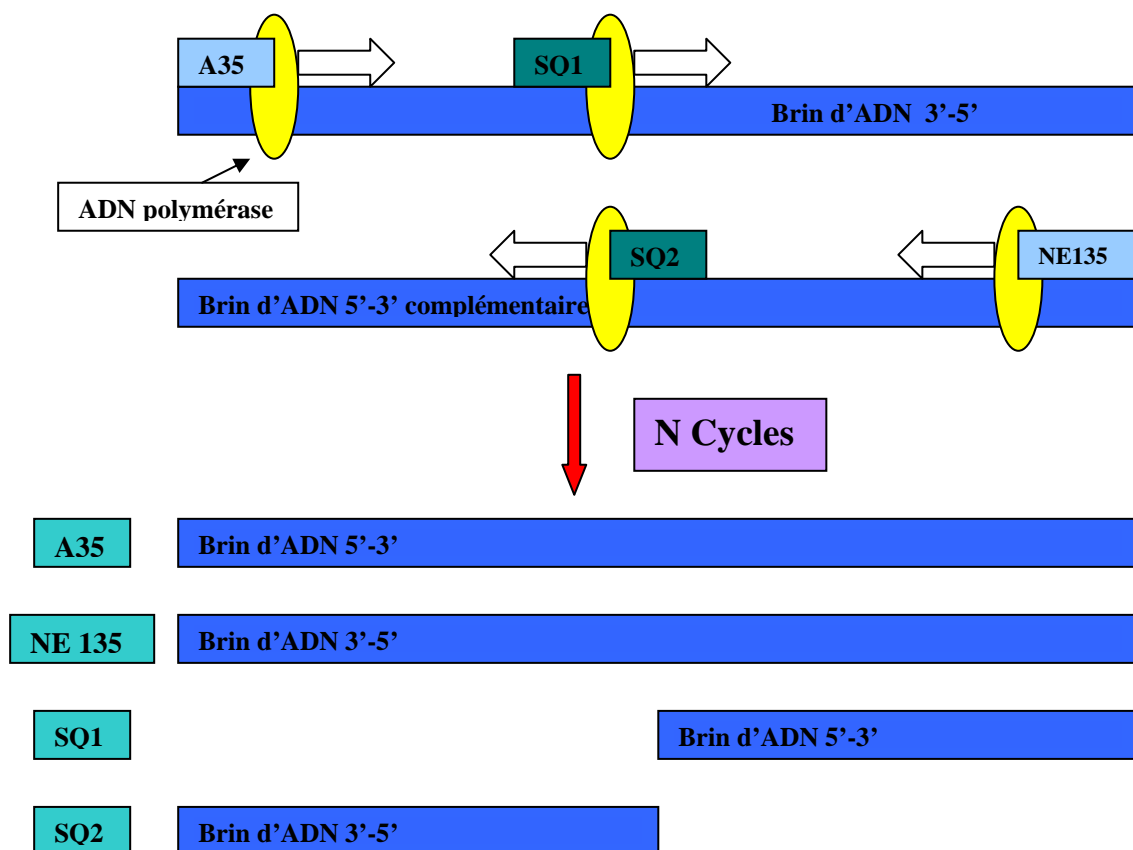
*Après amplification du gène de la protéase, les fragments d'ADN (environ 300 paires de bases) migrent, puis sont révélés sous la forme d'une bande visible en UV (MT : Marqueur de taille).*

### 3.2.4 Purification des produits de PCR nichée

Elle permet d'éliminer les amorces et autres produits qui pourraient gêner le séquençage. Pour réaliser cette purification nous utilisons 350 µl de gel P100 (Bio-gel P100 fine, Biorad stocké à 4°C) que nous déposons dans des puits filtrants (Millipore Multiscreen). Le gel est ensuite tassé par centrifugation à 1000tr/mn pendant 3 mn. Les produits de PCR sont déposés sur le gel; la filtration s'effectue lors d'une nouvelle centrifugation à 1000 tr/mn pendant 5 mn. L'ADN purifié est récupéré dans une plaque à fond rond (Costar, Polylabo)

### 3.2.5 Réaction de séquence

Pour les réactions de séquence, nous avons utilisé le kit ABI Prism™ Big Dye™ Terminator de Perkin Elmer-Applied Biosystems contenant l'AmpliTaq® DNA polymérase. Les amorces utilisées sont celles de la PCR nichée c'est à dire A35 et NE135 pour la TI, 5'Prot 2 et 3' Prot 2 pour la protéase (tableau IX) ; elles donnent lieu à 2 réactions de séquence pour chaque enzyme afin d'obtenir un brin sens et anti-sens. Pour la TI, lorsque le signal de la bande obtenue après électrophorèse est faible, on peut utiliser lors la réaction de séquence, en plus des amorces A35 et NE135, les amorces SQ1 et SQ2 : lors de l'hybridation, elles se fixent au milieu de la séquence et démarrent chacune la synthèse de 2 nouveaux brins dans le sens 5'-3' (figure 15).



**Figure 15:** Schéma de l'élongation (TI).

Après préparation des mélanges réactionnels (tableau XVI), les microtubes sont placés dans le thermocycleur GeneAmp PCR system 9600 du laboratoire Perkin Elmer, le programme du tableau XVII est alors mis en route.

**Tableau XVI: Mélange réactionnel de la réaction de séquence (quantité nécessaire pour une réaction)**

	<i>Quantité ajoutée en <math>\mu</math>l</i>	<i>(Témoin du kit)</i>
eau distillée	8	8,4
amorce (3,2 $\mu$ M)	1	amorce de pgem : 4
Produit de nested PCR purifié	5	pgem : 1,6
Mix BDT	4	4
Buffer 5X	2	2

**Tableau XVII: Programme de la réaction de séquence sur thermocycleur Gène Amp PCR system 9600**

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Opération effectuée</i>
<b>96</b>	<b>10 secondes</b>	<b>25 cycles</b>	<b>dénaturation</b>
<b>50</b>	<b>5 secondes</b>		<b>hybridation</b>
<b>60</b>	<b>4 minutes</b>		<b>élongation</b>

Une fois la réaction de séquence terminée, une purification est pratiquée selon le même principe que celle des produits de PCR mais en utilisant cette fois le biogel G50 nécessitant une réhydratation de 2h (biogel G50 fine, Pharmacia).

Les produits de séquence sont récupérés dans une plaque pour séquenceur 3100 Thermofast® 96 Detection plate de chez Abgène.

### **3.2.6 Le séquençage**

Le séquençage permet de définir l'enchaînement nucléotidique des différentes séquences ; il est réalisé sur le séquenceur automatique ABI PrismR 3100 Genetic Analyser fabriqué par la société Applied Biosystem.

La séparation des fragments se fait dans un tube capillaire rempli de résine et se réalise en continu. Ce séquenceur possède 16 capillaires permettant d'effectuer 16 réactions simultanément. L'excitation des fluorochromes se fait à 2 longueurs d'onde différentes (488 et 514 nm) par un laser à l'argon. L'émission est mesurée à 4 longueurs d'onde correspondant aux 4 fluorochromes. Chaque base a donc un signal spécifique qui permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre situé à la sortie du capillaire. A partir de ces données, l'ordinateur construit le chromatogramme. A partir des pics, l'ordinateur construit des matrices. Celles-ci permettent de déterminer la portion réelle du signal émis par un fluorochrome et de soustraire la partie provenant des autres. Ces pics sont utilisés pour déterminer la séquence nucléotidique de l'échantillon de départ. Lorsque plus de 50% du signal est attribuable à des bases différentes, l'ordinateur considère la base comme non identifiée.

### **3.2.7 Les logiciels informatiques**

Le logiciel utilisé sur le séquenceur 3100 est Data collection Software version 1.1 ; il est associé au logiciel Séquencing Analysis 3.7 qui permet de visualiser les chromatogrammes. Le logiciel MT Navigator 68 K.1 permet l'alignement des séquences des brins sens et anti-sens avec les séquences de référence de la protéase ou de la TI afin de déterminer la présence ou non de mutations.

Un programme d'analyse clinique des séquences et de rendu des résultats du séquençage a été utilisé pour déterminer la liste des mutations présentes sur les gènes codant pour la TI et la protéase. Il est appelé Greg P et a été développé sous l'impulsion de l'ANRS par Jean Louis Ghez du CISIH de Grenoble et Anne Schmuck du laboratoire de virologie de Grenoble.

## **4 Technique de séquençage adaptée aux souches virales de sous-type J.**

### **4.1 Extraction**

La technique automatique utilisant le kit Nuclisens EasyQ® du laboratoire Biomérieux et l'extracteur automatique Nuclisens™ Extractor du même laboratoire ont été utilisés pour le génotypage des souches virales de type J. Les charges virales des patients étudiés étant comprises entre 0 et 10700, la technique automatique, plus sensible, a été préférée à la technique manuelle du laboratoire Macherey Nagel.

### **4.2 Amplification de l'ARN plasmatique**

#### **4.2.1 Choix des amorces**

En plus des logiciels informatiques utilisés habituellement pour le séquençage, nous avons utilisé un programme d'alignement de séquence disponible via Internet et nommé Clustalw. Il nous a permis de déterminer les amorces consensus pour l'amplification de la TI des sous-types J. Ce logiciel est disponible à l'adresse suivante : <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

##### **4.2.1.1 Polymorphisme du sous-type J au niveau des sites de fixation des amorces**

Nous avons tout d'abord analysé les 2 séquences de référence du sous-type J (LosAlamosNationalLaboratory 2005). Nous avons repéré les régions où les amorces utilisées en routine doivent se fixer, afin d'observer un éventuel polymorphisme à ce niveau qui pourrait expliquer un défaut de fixation et donc une absence d'amplification de l'ARN.

L'alignement des 2 séquences de référence du sous-type J (1AF082394 et 1AF082395) avec celle du sous-type B (U21135) a permis de révéler des variations de nucléotides au niveau de certains sites de fixations des amorces (figure 16).



**Figure 16: Comparaison des séquences de référence du sous-type J au niveau des sites de fixation des amorces, avec la séquence de référence B.**

La zone précise où se fixe la polymérase et le sens de l'élongation sont indiqués par la flèche. Les nucléotides soulignés sont ceux présentant des variations :

Le choix de nouvelles amorces a été nécessaire au vu du polymorphisme existant au niveau des sites de fixation des amorces MJ4 et NE135, notamment à l'endroit où se fixe la polymérase ; nous les avons nommées MJ4J et NE135J.



#### 4.2.1.2 Polymorphisme de la forme recombinante CRF11 au niveau des sites de fixation des amorces

Le reclassement des souches de type J en forme recombinante CRF11, nous a amené à reconsidérer nos amorces spécifiques du sous-type J. Dans cette 2<sup>ème</sup> étape nous avons voulu obtenir des amorces consensuelles des sous-types J et CRF11. Pour cela, nous avons aligné les 2 séquences de référence J et les 11 séquences de référence CRF11. En comparant les zones de fixation des amorces des 13 séquences, il ne nous est pas apparu nécessaire de modifier les amorces MJ3, MJ4-J et A35. Par contre, des changements ont été apportés pour l'amorce NE135J ; la zone de fixation de celle-ci est indiquée entre crochet et celle de l'amorce consensus NE135-CRF11 est comprise entre les 2 flèches :

<b>CRF11 :</b>		↓		↓
7AJ291720	GGA[ATGTTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
8AF179368	AGA[GAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
10AY371150	AGA[ATGTTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
13AY371153	AGA[ATGTTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
5AJ291718	AGA[ATGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
3AF492623	GGA[AAGCTGGACTGTCAATGAYATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
6AJ291719	GGA[AAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
9AY371149	GGA[AAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
4AF492624	GGA[ATGTTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
11AY371151	GGA[AAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
12AY371152	GGA[AAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGG]GAAAA			
<b>J :</b>				
1AF082394	AGA[ <u>AGACT</u> GGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
2AF082395	AGA[ <u>AGAT</u> TGGACTGTCAATGATATACAAAAGTTAGTGG]GAAAA			
	↶			
<b>B :</b>				
U21135 B :	AGA[CAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGG]GGAAA			

**Figure 18 :** Site de fixation de l'amorce NE135-CRF11 (entre les 2 flèches).

**NE 135-CRF11 :** 5'-3' TTTTCCCCTAACTTTTGTATATCATTGACAGTCC

Les températures de fusion des amorces NE135J, MJ4J et NE135-CRF11 sont équivalentes à celles des amorces originales, en effet, après modification de ces dernières, le GC% ne varie pas suffisamment pour modifier cette température significativement.

Rappelons que celle-ci se calcule selon la formule :

$T^{\circ}\text{fusion} = 4(G+C) + 2(A+T)$  où (A+T) et (G+C) représentent le nombre de paires de bases contenu dans l'amorce pour chaque couple de nucléotides. Les températures d'hybridation utilisées lors des étapes d'amplification étant calculées en fonction des températures de fusion du couple d'amorce utilisé, elles n'ont donc pas été modifiées.

#### **4.2.2 Amplification, purification, réaction de séquence, séquençage**

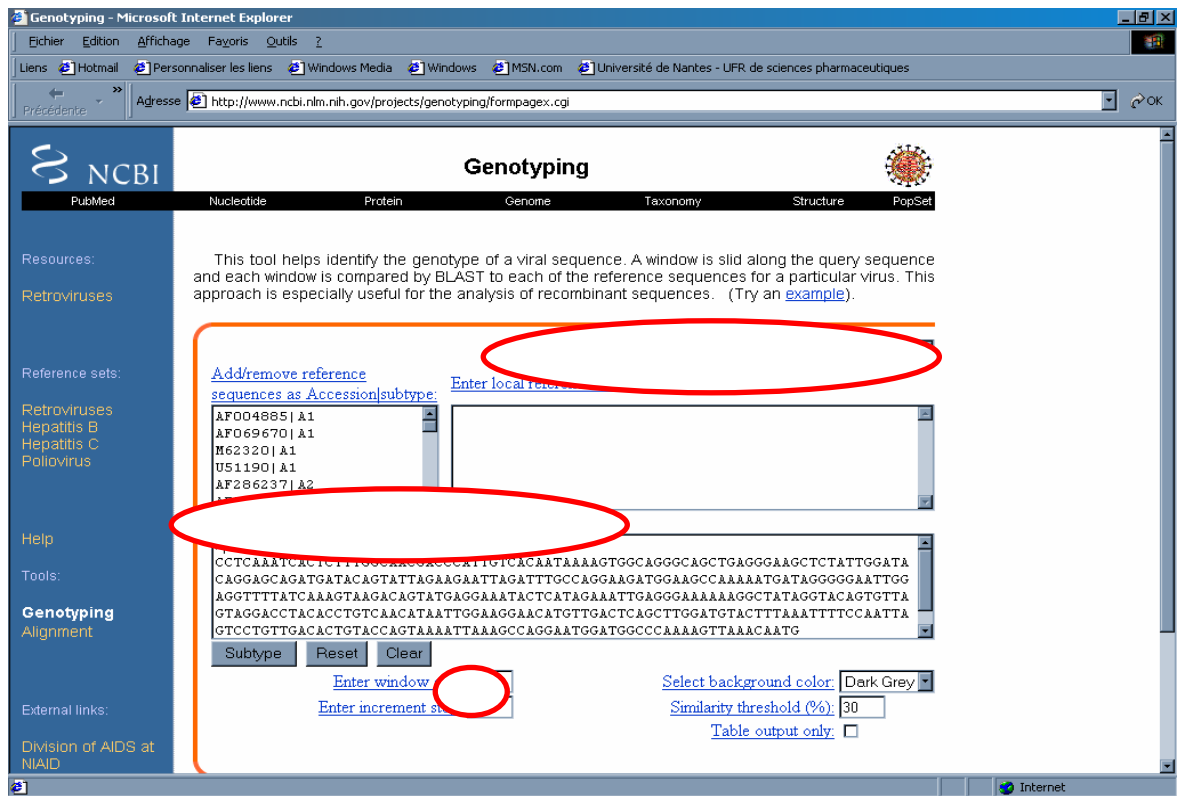
Les enzymes utilisées pour l'amplification, le matériel de purification et de séquençage ainsi que les thermocycleurs sont les mêmes que ceux décrits dans les paragraphes 3.2.2 à 3.2.5. . Par ailleurs, les quantités de réactifs et d'échantillons utilisées pour les mélanges réactionnels (amplification, réaction de séquence, séquençage) et les programmes enregistrés sur les thermocycleurs sont identiques.

## **5 Typage du VIH**

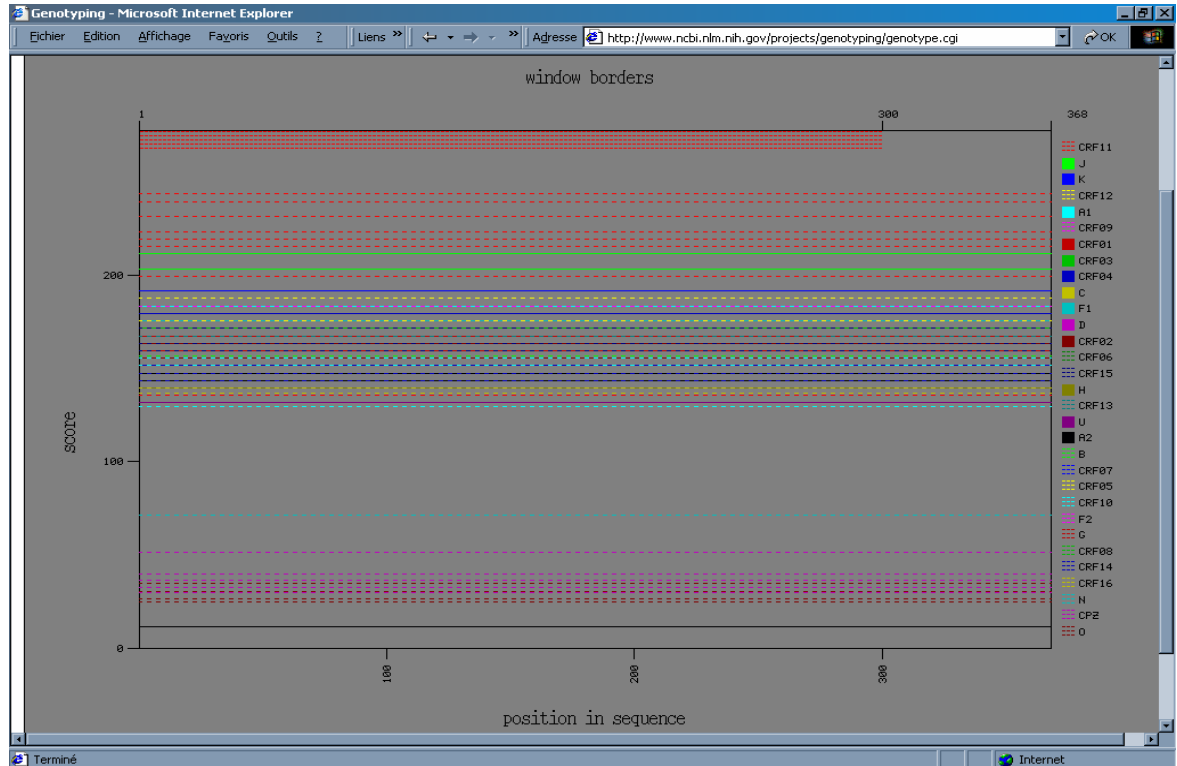
Le typage des souches du VIH-1 est effectué grâce au logiciel du groupe NCBI disponible sur Internet à l'adresse suivante :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpagex.cgi>

Il détermine, grâce aux séquences correspondantes à la TI et/ou à la protéase, le sous-type de la souche virale. L'analyse peut se faire sur la séquence globale ou sur des morceaux de séquence dont la longueur est paramétrable (taille de la fenêtre ou Window size) ; ces séquences sont analysées et comparées aux séquences de référence des différents sous-types ; le logiciel calcule un score d'homologie qui déterminera statistiquement l'appartenance de la souche à tel ou tel sous-type. Dans notre étude, nous avons déterminé le sous-type en analysant séparément les séquences correspondantes à la protéase et/ou à la TI. Pour la protéase, la taille de la fenêtre a été fixée à 300 nucléotides; pour la TI, elle est de 600 nucléotides. Ces paramètres permettent une analyse globale de chaque séquence.



**Figure 19 :** Logiciel BLAST du groupe NCBI : page d'accueil.



**Figure 20:** Logiciel BLAST du groupe NCBI.

Analyse effectuée sur le gène de la protéase d'une forme recombinante CRF11 : l'axe des abscisses représente la position dans la séquence, l'axe des ordonnées le score obtenu.

# **RESULTATS**

## 1 Cohorte étudiée

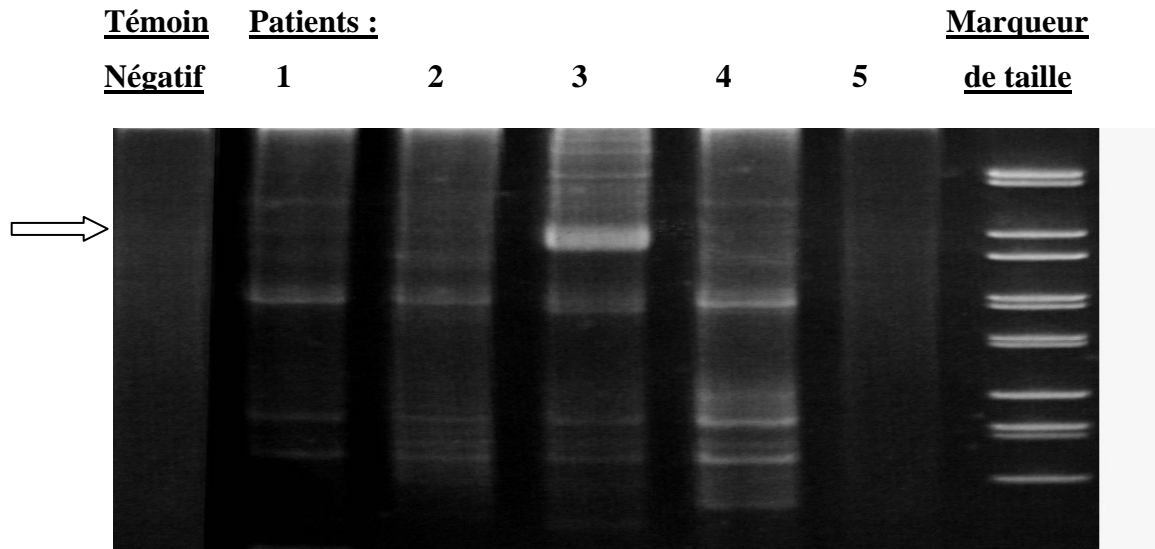
Depuis 1999, les souches virales de 9 patients ont été classées dans le sous-type J après analyse de la région codante pour la protéase. Cinq patients ont été sélectionnés car ils disposaient d'une plasmathèque; quatre sont ou ont été suivis au CISIH de Nantes et un au CHU de St Nazaire. Les caractéristiques principales de ces patients sont résumées dans le tableau XIX. Après réactualisation des banques de données, 4 des 5 patients sélectionnés ont vu leur souche virale reclassée en CRF11 après analyse du gène de la protéase. Le 4<sup>ème</sup> patient, malgré une charge virale indétectable, a été retenu car le gène de la protéase avait pu être amplifié sur ce prélèvement.

**Tableau XIX: Caractéristiques des patients de souche virale de type J.**

Patients	Age	Sexe	Date de séropositivité	Sous-type initial (Protéase)	Sous-type après remaniement	Charge virale au moment de l'examen (cop/ml)
1	28	F	1994	J	CRF11	10700
2	33	M	1993	J	CRF11	1490
3	33	F	2000	J	J	3100
4	32	M	Inconnue	J	CRF11	<80
5	27	M	1998	J	CRF11	7100

## 2 Utilisation des amorces MJ4 J et NE 135 J spécifiques du sous-type J.

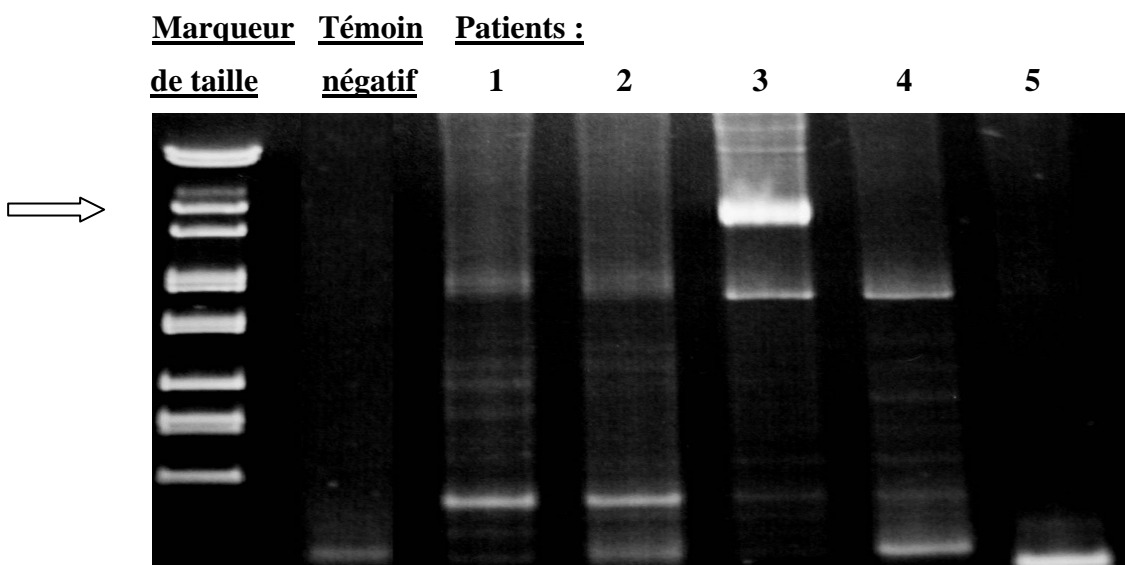
Les conditions dans lesquelles a été réalisée cette amplification (RT PCR + PCR nichée) sont strictement les mêmes que celles habituellement utilisées en routine et décrites dans le paragraphe 3 de la section « matériels et méthodes ». Nous avons seulement remplacé les amorces MJ4 et NE135 par respectivement, MJ4 J et NE135 J. La figure 21 représente la piste d'électrophorèse obtenue après migration des fragments d'ADN amplifiés.



**Figure 21 :** Migration électrophorétique des fragments d'ADN après amplification du gène codant pour la TI (amorces MJ3/MJ4J et A35/NE135J)  
La flèche indique la zone de migration du fragment correspondant à la TI (environ 700 pb).

### 3 Utilisation des amorces MJ4 J et NE 135-CRF11.

En respectant toujours les mêmes conditions d'amplification, nous avons utilisé les amorces MJ4 J et NE135-CRF11 remplaçant respectivement MJ4 et NE135 :



**Figure 22:** Migration électrophorétique des fragments d'ADN après amplification du gène codant pour la TI (amorces MJ3/MJ4J et A35/NE135-CRF11)

## **4 Séquençage de l'ARN et typage de la souche du patient n°3.**

Le séquençage de l'ARN correspondant à la TI a pu être réalisé pour la souche virale du patient n°3, seul échantillon ayant présenté une bande caractéristique à l'électrophorèse. Le typage de la souche virale à partir de la séquence correspondante à la TI classe celle-ci en CRF11.

## **5 Analyse des résultats**

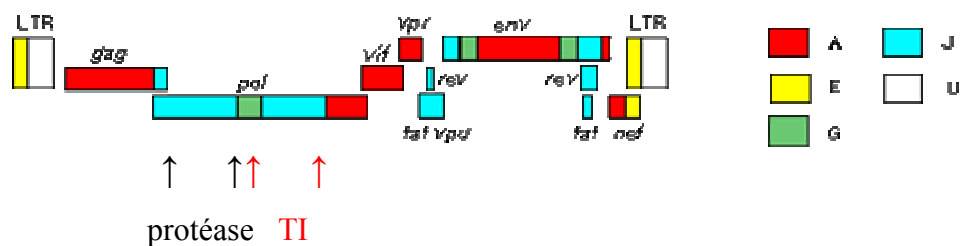
L'analyse des tableaux VI et VII (page 55) nous montre, en toute logique, que plus la charge virale est basse plus il est difficile d'amplifier l'ADN, que la souche appartienne au sous-type B ou non B. Pour ces 2 groupes, le seuil de charge virale pour lequel nous obtenons 100% d'amplification est plus bas pour la protéase que pour la TI ; en effet, le gène de la protéase étant plus court, celui-ci est plus facilement amplifiable pour des charges virales basses. Par ailleurs, cette étude montre qu'il est plus difficile d'amplifier le gène de la TI des souches virales de type non B par rapport à celles de type B pour des charges virales comprises entre 200 et 10000. Il semble donc que le manque de spécificité des amorces soit effectif pour des charges virales proches de cette zone. Par contre, l'amplification sur le gène de la protéase est équivalente quel que soit le sous-type.

Les 5 patients étudiés présentaient une charge virale comprise entre <50 et 10700 au moment de l'examen. Nous avons consulté leurs antécédents pour voir si un autre génotypage avait été réalisé avec des charges virales plus élevées. Dans les antécédents du patient n°3, l'amplification sur la TI n'avait pas eu lieu alors que la charge virale était de l'ordre de 40000. Il s'avère que, malgré une charge virale plus haute, l'amplification de la TI pour ce patient soit difficile.

L'amplification de l'ARN de la souche virale du patient n°3 a pu être réalisée après synthèse de nouvelles amorces, plus spécifiques. L'utilisation des amorces spécifiques du sous-type J a permis d'amplifier le gène de la TI du patient n°3, le seul dont la souche virale a conservé le même sous-type après remaniement de la

classification. Nous nous attendions à ce que cette souche soit classée en sous-type J après analyse du gène de la TI nouvellement amplifié. Or, le logiciel BLAST a classé cette souche en CRF11. Un début d'explication peut être proposé au vue de l'organisation génomique de la forme recombinante CRF11 (figure 23).

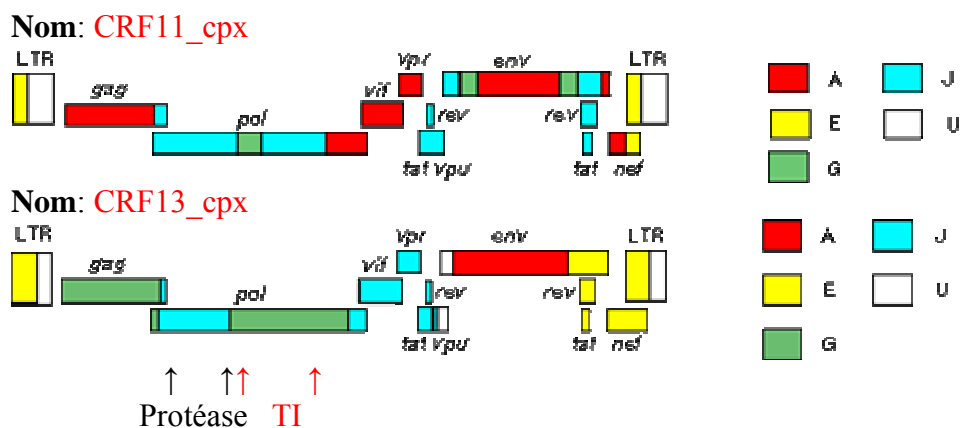
En effet, il se peut que le logiciel ne différencie pas les sous-types J et CRF11 sur certaines parties du génome, celles-ci étant relativement proches au niveau de la séquence nucléotidique et trop courtes pour permettre une bonne discrimination.



**Figure 23:** Organisation génomique de la forme recombinante CRF11.

Sur cette figure, nous pouvons voir que, sur la seule analyse du gène de la protéase, la souche peut être classée indifféremment en sous-type J ou CRF11.

Les 4 souches qui ont été reclassées en CRF11 sur l'analyse de la protéase n'appartiennent ni au sous-type J ni au CRF11 sur la TI car les amorces spécifiques utilisées n'ont pas permis l'amplification de celle-ci. Une hypothèse peut être proposée en examinant les autres formes recombinantes possédant dans leur génome des portions de gène communes au CRF11 et au sous-type J (figure 24).



**Figure 24:** Organisation génomique des formes recombinantes CRF11 et CRF13.

Nous pouvons observer au niveau du gène codant pour la protéase que la souche peut être classée en sous-type CRF11 ou CRF13. En supposant que la souche appartienne au sous-type CRF13 et non CRF11, l'absence d'amplification sur le gène de la TI pourrait alors être expliquée par un manque de spécificité des amorces CRF11 vis-à-vis du sous-type CRF13, pour des charges virales basses. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait définir des amorces spécifiques de ce sous-type et tenter d'amplifier le gène de la TI.

**2ème partie : Etude des sous-types non B  
de patients suivis au CISIH de Nantes  
entre 1997 et 2004.**

## **Matériels et méthodes**

## 1 Les patients

Cette étude rétrospective a consisté en 1<sup>er</sup> lieu, à répertorier tous les patients VIH-1 pour lesquels un génotype de résistance a été prescrit durant la période qui s'étend de 1<sup>er</sup> mars 1997 au 31 décembre 2004. Tous ces patients sont ou ont été suivi au CISIH de Nantes.

Nous avons listé 603 patients. Pour chacun nous avons déterminé la date de 1<sup>ère</sup> séropositivité pour le VIH grâce au logiciel NADIS ; nous pourrions ainsi évaluer la prévalence des sous-types non B depuis 20 ans sur cette cohorte.

Le typage des virus à partir de l'analyse phylogénétique des séquences du gène de la TI et/ou de la protéase n'est fait systématiquement que depuis 2002 au laboratoire de virologie de Nantes ; il a donc fallu typer les souches ayant bénéficié d'un génotype avant cette période et ce, à partir de leurs séquences stockées dans la base de données informatique. De plus, il est apparu, suite au remaniement de la classification, consécutive à l'émergence de formes recombinantes, que certaines souches classées dans un sous-type il y a quelques années, étaient considérées comme des formes recombinantes en 2005. Nous avons donc typé toutes les souches non B depuis 1997 afin de réactualiser la classification.

En 2<sup>ème</sup> lieu, une étude plus approfondie des sous-types non B a été mise en œuvre : le but de celle-ci est d'analyser les séquences correspondantes à la TI et à la protéase de patients non B, naïfs de tout traitement. Les génotypes de ces derniers ont pu être récupérés de 2 façons :

- soit le génotypage a été réalisé alors que le patient était naïf de tout traitement: les séquences correspondantes ont pu être reprises dans la base de données et analysées telles quelles.
- soit le génotypage a été prescrit en cours de traitement dans quel cas nous avons cherché dans la plasmathèque du patient, un échantillon prélevé avant l'instauration de toute thérapeutique (dans le cadre d'une demande de charge virale par exemple). Un génotype a été fait sur les échantillons disponibles.

En parallèle, nous avons analysé plusieurs séquences de patients naïfs dont la souche virale appartient au sous-type B ; ce groupe témoin nous permettra de comparer le polymorphisme observé sur le gène de la protéase et de la TI des patients non B à ceux du groupe B. Les séquences de ce groupe témoin ont été extraites de la base de données informatique du laboratoire. L'analyse des séquences a été faite en utilisant l'algorithme d'interprétation des résistances de l'ANRS, version juillet 2005.

## **2 Les prélèvements**

Nous travaillons sur des échantillons de plasma conservés à -80°C. Les prélèvements ont été effectués sur anticoagulant EDTA dans le cadre d'une prescription de charge virale et/ou d'un génotypage. L'acheminement et le traitement des échantillons au laboratoire se fait de la même façon que décrite dans le paragraphe 2 de la section « matériels et méthodes » de la 1<sup>ère</sup> partie de cette thèse.

## **3 La technique de séquençage**

La procédure utilisée est celle adaptée aux souches virales de type B et décrite dans le paragraphe 3 de la section « matériels et méthodes » de la 1<sup>ère</sup> partie.

## **4 Typage du VIH**

Le typage des souches a été effectué grâce au logiciel BLAST du groupe NCBI disponible sur Internet à l'adresse suivante :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpagex.cgi>

# **RESULTATS**

# 1 Distribution des sous-types VIH-1 dans la cohorte nantaise

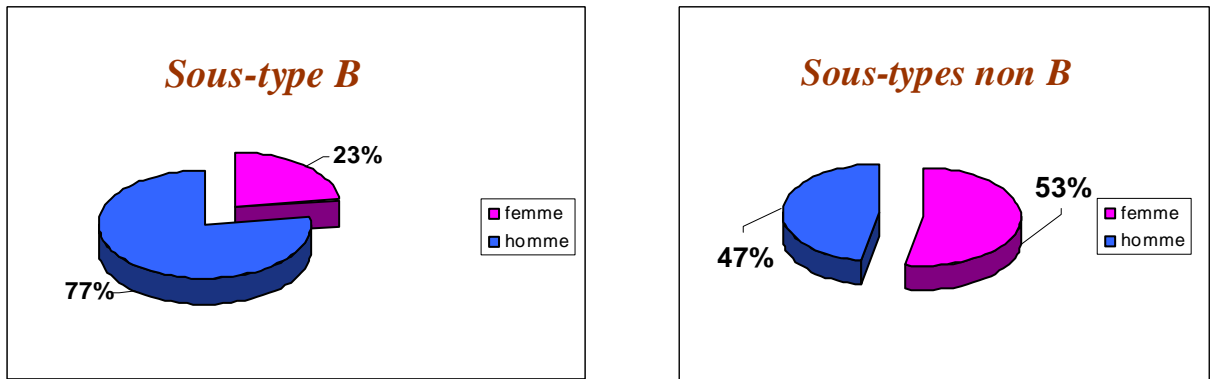
## 1.1 Caractéristiques des patients

Du 1<sup>er</sup> mars 1997 au 31 décembre 2004, 603 patients ont été inclus dans notre étude ; tous ont eu un génotype prescrit, que ce soit avant la mise en œuvre d'un traitement ou à la suite d'un échec thérapeutique. Sur 603 patients, 93 ont une souche virale de type non B (15,3%).

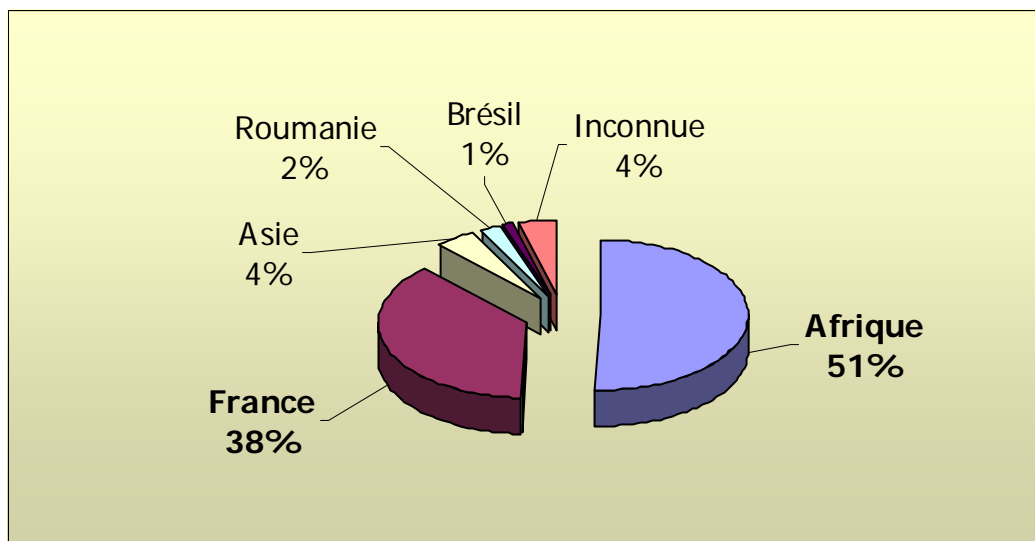
Les principales caractéristiques de ce groupe de patients (n=603) sont présentées ci après ; l'âge des patients pris en compte est celui qu'ils avaient au moment de la découverte de séropositivité, lorsque celle-ci est connue. Pour 35 patients, la date de séropositivité étant inconnue, l'âge retenu est celui qu'ils avaient au moment du 1<sup>er</sup> génotypage. Les modes de contamination des patients, selon qu'ils appartiennent au sous-type B ou non B, sont répertoriés dans les figures 26 et 27. Les caractéristiques individuelles des 93 patients et notamment leur origine géographique, sont décrites en **annexe 1**.

**Tableau XX: Age moyen et médian du groupe étudié**

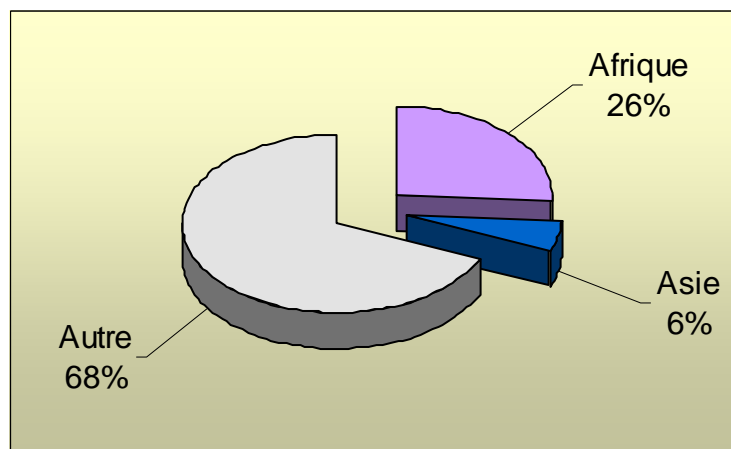
	<i>Sous-type B</i>	<i>Sous-type non B</i>
<b>Age moyen femme</b>	29,6	32,0
<b>Age médian femme</b>	26	30,0
<b>Age moyen homme</b>	31,7	35,8
<b>Age médian homme</b>	30	33,0



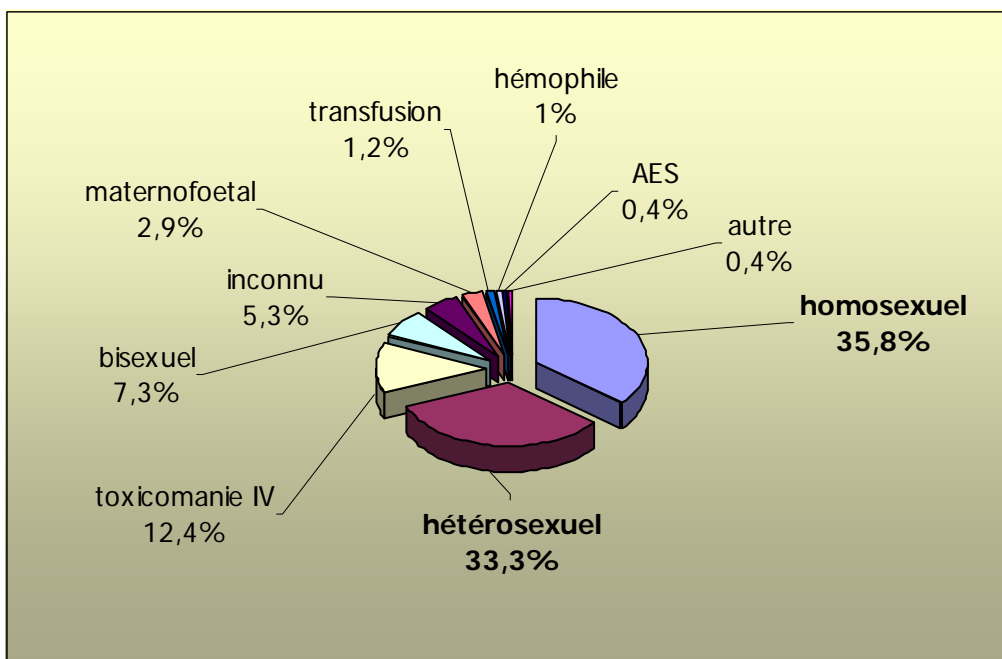
**Figure 25: Répartition homme/femme du groupe étudié.**



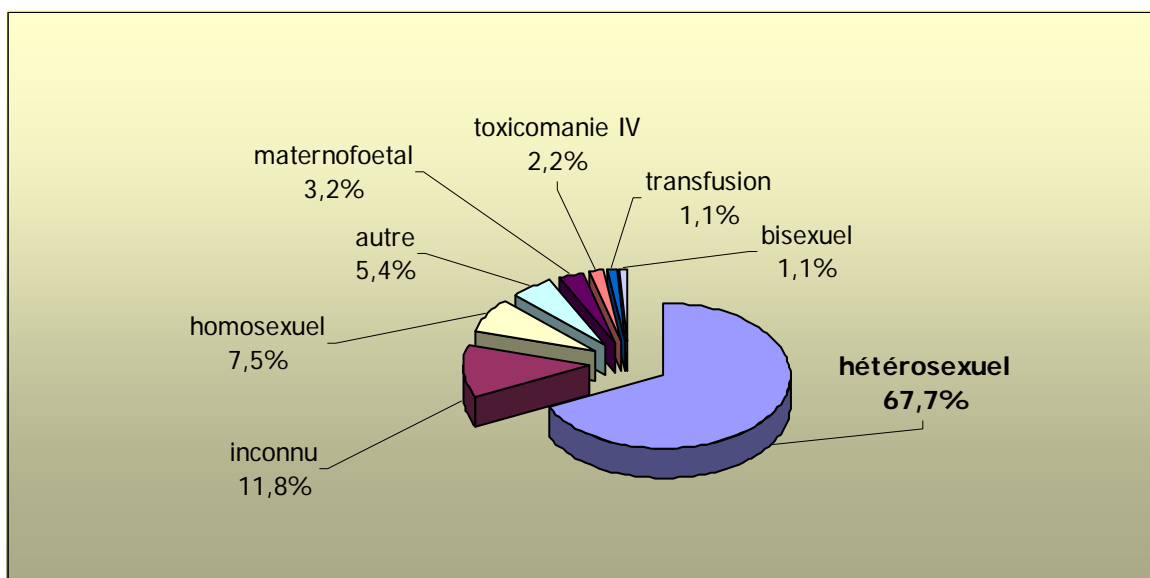
**Figure 26: Origine géographique des patients dont la souche virale appartient au sous-type non B.**



**Figure 27: Région de contamination des patients français dont la souche virale appartient au sous-type non B.**



**Figure 28:** Mode de contamination des patients dont la souche virale appartient au sous-type B.



**Figure 29:** Mode de contamination des patients dont la souche virale appartient au sous-type non B.

## 1.2 Distribution des sous-types non B dans la cohorte nantaise

La souche virale de chaque patient a pu être typée à partir de la séquence de la TI et/ou de la protéase. Lorsque le sous-type était concordant sur les 2 séquences, la souche a pu être classée. Parfois, une discordance apparaissait du fait de possible virus recombinant; pour ces souches, le sous-type a été déterminé en réunissant en une seule séquence, lorsque cela était possible, les séquences correspondantes à la protéase et à la TI ; en effet, celles-ci sont contiguës dans le génome du VIH, la protéase précédant la TI. Ainsi, nous avons réalisé une analyse globale de cette « séquence reconstituée » du gène *pol* en paramétrant dans le logiciel une taille de fenêtre de 900 nucléotides (600+300). Les formes recombinantes étant constituées de séquences plus ou moins longues de différents sous-types, il nous a semblé plus juste d'effectuer le typage sur une région plus grande et donc plus représentative du génome.

Certaines souches déjà typées avant 2004 ont du être réexaminées et se sont retrouvées classées en formes recombinantes. Le tableau XXI regroupe ces souches ainsi que celles ayant présentées des sous-types discordants sur l'analyse phylogénétique de la protéase et de la TI. Le 1<sup>er</sup> typage correspond à celui effectué avant 2000, période pendant laquelle les souches recombinantes n'étaient pas encore identifiées ; le 2<sup>ème</sup> typage correspond à celui effectué en 2004 ; le 3<sup>ème</sup> correspond à celui effectué sur la séquence reconstituée (protéase + TI).

Lorsqu'une seule séquence a été amplifiée, le sous-type de la souche a été déterminé dans un 1<sup>er</sup> temps sur l'analyse globale de la séquence disponible, généralement celle codant pour la protéase ; malgré tout, au vu de l'organisation génomique des formes recombinantes (figure 6), la seule analyse phylogénétique de cette courte séquence ne nous a pas semblé suffisante pour classer la souche ; en effet, une souche classée A sur la protéase, peut très bien être une forme recombinante CRF01 ou CRF15. Par contre, une souche classée H sur la protéase, a de forte chance de l'être réellement car aucune forme recombinante ne possède

au niveau de cette région le gène correspondant au sous type H. Il en est de même pour le sous-type B.

Le tableau XXII propose de regrouper certains sous-types avec le ou les formes recombinantes qui en découlent dans les cas où seule la séquence correspondant à la protéase est disponible.

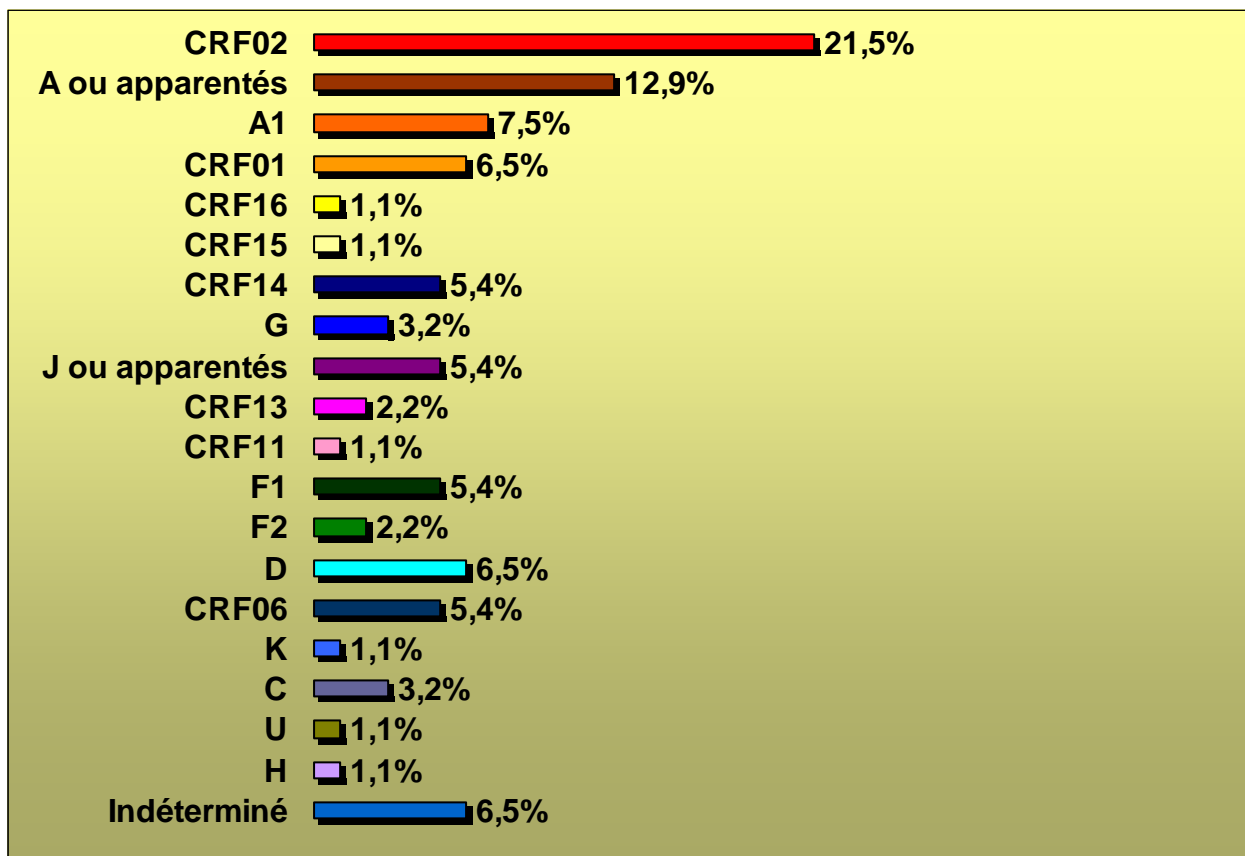
**Tableau XXI: Souches virales de type non B reclassées en 2004 et/ou présentant une discordance de sous-type sur l'analyse des séquences correspondant à la protéase et à la TI :**

Patients	1er typage		2ème typage		3ème typage
	Protéase	TI	Protéase	TI	Protéase + TI
1	F1	F1	CRF12	F1	F1
2	G	G	CRF14	CRF14	CRF14
3	J	pas disponible	CRF11		
4	J	pas disponible	CRF11		
5	J	CRF non défini	CRF13	CRF11	CRF13
6	CRF02	CRF02	CRF06	CRF06	CRF06
7	A1	A1	CRF03	A1/CRF01	A1
8	A1	CRF02	CRF02	CRF02	CRF02
9	H	H	CRF11	H	H
10	CRF01	CRF01	CRF15	CRF01	CRF01
11	A1	pas disponible	A1	CRF01	CRF01
12	CRF02	Pas disponible	CRF02	CFR06	CRF06
13	non défini	A2	CRF15	CRF16	CRF16
14	CRF02	F2	CRF02	F2	F2
15			CRF07	B	B
16			CRF07	B	B
17			CRF07	B	B
18			A1/CRF03	CRF01	CRF15
19			CRF01/15		non réalisée
20			CRF03	A1	A1
21			D	D	D
22			D/CRF05	B	D
23			CRF02	CRF01	CRF01
24			CRF03	CRF01	A1
25			CRF03/CRF15	CRF01	CRF01
26			K/CRF01	CRF09	K
27			CRF06	D	CRF14
28			CRF12	F1	F1
29			U/CRF02	F1	non réalisée
30			D	A1	D
31			J	CRF11	J

**Tableau XXII: Proposition de classification des souches virales de type non B sur la seule analyse du gène de la protéase**

<b>Sous type sur la protéase</b>	<b>Classification de la souche</b>
<b>A1, A2, CRF01, CRF02, CRF03, CRF15, CRF16</b>	<b>A ou apparentés (CRF01, CRF02, CRF03, CRF15, CRF16)</b>
<b>G, CRF14</b>	<b>G ou apparentés (CRF14, CRF02, CRF13)</b>
<b>J, CRF11, CRF13</b>	<b>J ou apparentés (CRF11, CRF13)</b>
<b>F1, F2, CRF12, CRF05</b>	<b>F ou apparentés (CRF12, CRF05)</b>
<b>A2, CRF16</b>	<b>A2 ou apparentés (CRF16)</b>
<b>D, CRF05, CRF10</b>	<b>D ou apparentés (CRF05, CRF10)</b>
<b>CRF07</b>	<b>B ou CRF07</b>
<b>U, CRF04</b>	<b>U ou CRF04</b>
<b>K, CRF06</b>	<b>K ou CRF06</b>
<b>C</b>	<b>C ou apparentés (CRF07, CRF08)</b>
<b>H</b>	<b>H</b>

La figure 30 représente la distribution des différents sous-types rencontrés dans la population dont la souche virale appartient au sous-type non B, après remaniement de la classification (n=93). Les formes indéterminées sont celles dont seule la séquence de la protéase est disponible et dont le sous-type n'a pu être déterminé par le logiciel (même score pour 2 sous-types différents). Trois souches ont été classées en forme recombinante CRF07 sur la protéase et en B sur la TI ; l'analyse globale de la séquence reconstituée protéase + TI classe la souche en sous-type B. Finalement, ces 3 souches ont été classées en sous-type non B indéterminé. Une autre forme, dont les 2 séquences sont disponibles, est classée en sous-type U ou CRF02 sur la protéase et en sous-type F1 sur la TI ; nous n'avons pas pu reconstituer la séquence « protéase + TI », elle a donc été considérée comme indéterminée.



**Figure 30:** *Distribution des souches virales de type non B de 93 patients suivis au CISIH de Nantes (1984-2004)*

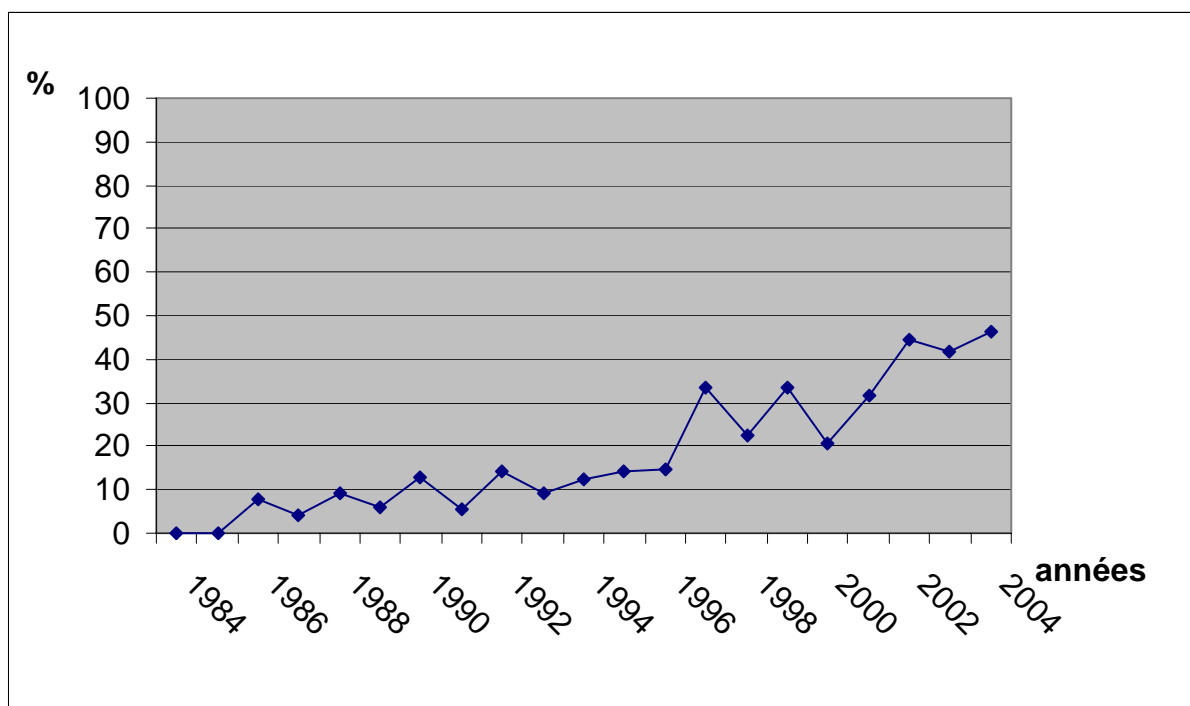
Les souches de type A et celles apparentées (CRF01, CRF02, CRF15) représentent au total 49,5% des souches de type non B.

### **1.3 Evolution de la proportion des souches de type non B à Nantes.**

Sur les 603 patients étudiés, nous avons pu établir l'année de séroconversion vis à vis du VIH pour 568 d'entre eux. Nous avons comptabilisé pour chaque année (de 1984 à 2004), le nombre de nouveaux patients séropositifs et le pourcentage de souches de type non B parmi celles-ci (tableau XXIII). La figure 31 illustre ce tableau.

**Tableau XXIII: Proportion des souches de type non B chez les patients VIH-1 nouvellement diagnostiqués entre 1984 et 2004.**

Années	Nombre de nouveaux patients séropositifs	Nombre de souches de type non B	% de souches de type non B
1984	7	0	0
1985	17	0	0
1986	26	2	7,7
1987	25	1	4
1988	32	3	9,4
1989	34	2	5,9
1990	23	3	13
1991	56	3	5,4
1992	50	7	14
1993	33	3	9,1
1994	41	5	12,2
1995	35	5	14,3
1996	34	5	14,7
1997	18	6	33,3
1998	31	7	22,6
1999	18	6	33,3
2000	24	5	20,8
2001	22	7	31,8
2002	18	8	44,4
2003	12	5	41,7
2004	13	6	46,2



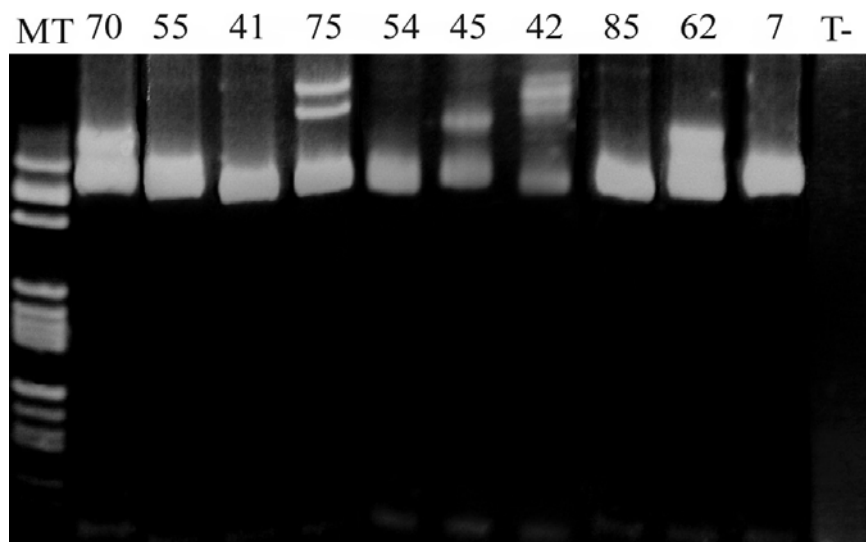
**Figure 31 : Evolution du % de souches de type non B au CHU de Nantes de 1984 à 2004.**

## 2 Etude de la transmission de souches virales résistantes parmi les souches de type B et non B.

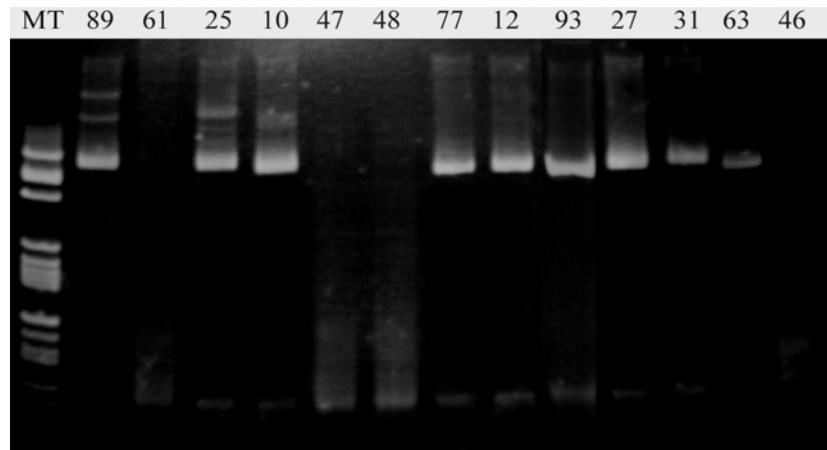
### 2.1 Les patients et les prélèvements

Afin d'analyser le polymorphisme des souches virales de type non B sur les gènes de la protéase et de la TI, nous avons regroupé les génotypes de patients naïfs de tout traitement.

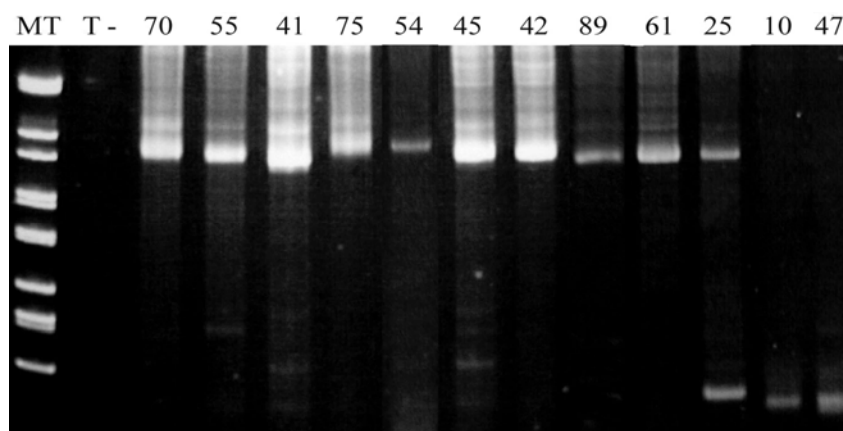
Sur les 93 patients : 33 ont eu un génotype prescrit avant l'instauration d'un traitement, 23 disposaient dans leur plasmathèque d'un échantillon prélevé avant toute thérapeutique. L'extraction de l'ARN sur ces 23 plasmas s'est faite grâce à la technique automatique pour 3 d'entre eux, la charge virale correspondante étant inférieure à 10000. Le reste des échantillons a été extrait en utilisant la technique manuelle. L'amplification de l'ARN extrait de chaque échantillon a été réalisée selon la méthode utilisée en routine; les clichés des gels obtenus après migration électrophorétique sont représentés ci-après ; le numéro de chaque piste correspond à la numérotation des patients selon l'annexe 1.



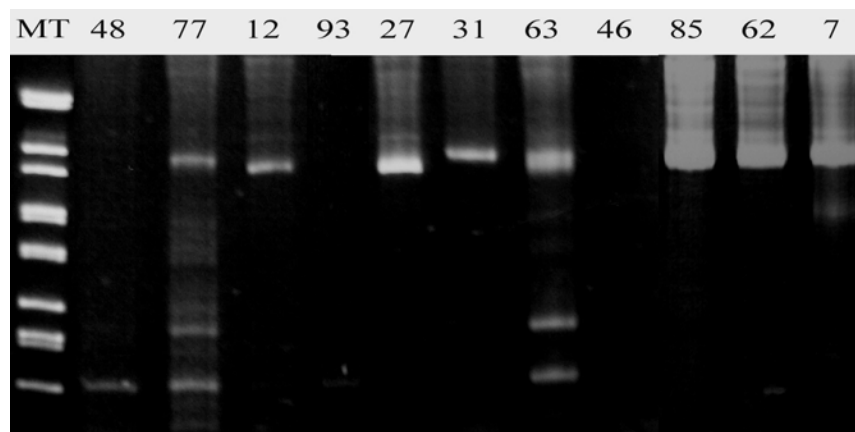
**Figure 32:** Amplification des échantillons réalisée sur le gène de la protéase (MT : Marqueur de taille ; T- : Témoin négatif)



***Figure 33: Amplification des échantillons réalisée sur le gène de la protéase.***



***Figure 34: Amplification des échantillons réalisée sur le gène de la TI.***



***Figure 35: Amplification des échantillons réalisée sur le gène de la TI.***

Sur 23 échantillons, nous avons pu amplifier le gène de la protéase pour 19 d'entre eux ; le gène de la TI a pu être amplifié sur 18 plasmas. L'ARN de 3 échantillons n'a pu être amplifié, que ce soit sur la protéase ou sur la TI. Celui de 4

échantillons n'a été amplifié que sur la protéase ; enfin, l'ARN d'un échantillon a été amplifié uniquement pour la TI.

En parallèle, un groupe témoin de patients naïfs de type B a été constitué grâce au logiciel NADIS, en confrontant la date du 1<sup>er</sup> génotype et la date de mise sous traitement: sur 510 patients, 68 ont eu un génotype avant traitement; leurs séquences ont été extraites telles quelles de la base de données puis analysées.

**Au final, nous avons pu étudier les souches virales de type non B et B de, respectivement, 53 et 68 patients** : nous avons pu analyser le gène de la TI et de la protéase pour 38 souches de type non B et 54 de type B ; le gène de la protéase a été le seul amplifié pour 14 souches non B et 12 souches B ; enfin, les ARN d'un échantillon pour les souches de type non B et deux pour les souches de type B ont été amplifiés uniquement sur TI.

**Tableau XXIV : Caractéristiques principales des 2 cohortes de patients naïfs (sous-types B et non B)**

	Homme	femme	Moyenne d'âge (Médiane)	% hétérosexuel	% homosexuel
<b>Sous type non B (N= 53)</b>	56,6%	43,4%	36,1 (35)	66%	11,3%
<b>Sous type B (N=68)</b>	82,4%	17,6%	38,2 (38)	29,4%	50%

## **2.2 Etude des séquences codant pour la protéase et la TI des patients naïfs**

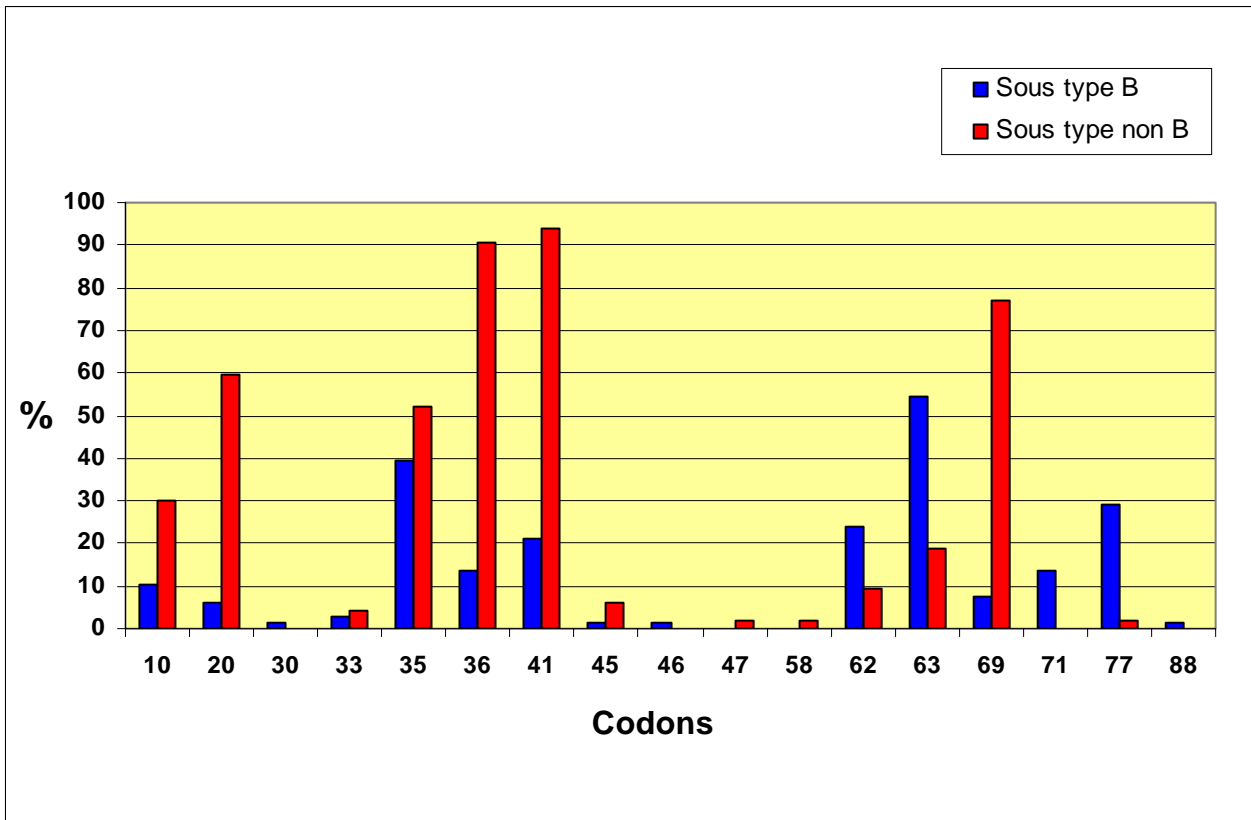
### **2.2.1 Codons impliqués dans la résistance aux antirétroviraux**

#### **2.2.1.1 Gène de la protéase**

Le tableau XXV répertorie les mutations de polymorphisme retrouvées sur le gène de la protéase pour les patients naïfs dont la souche virale appartient au sous-type non B (N=52) et B (N=66). Les mutations présentées touchent les codons habituellement responsables de résistances primaires ou secondaires décrites dans les algorithmes français. La figure 36 illustre ce tableau.

**Tableau XXV : Mutations de polymorphisme retrouvées sur les codons impliqués dans la résistance aux IP.**

<b>Sous-types non B : Codons impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de la protéase (N=53)</b>						<b>Sous-type B : Codons impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de la protéase (N=66)</b>					
Mutation	Nombre de séquences impliquées	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite	Mutation	Nombre de séquences impliquées	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite
<b>R41K</b>	<b>49 (92,4%)</b>		x			<b>L63P</b>	<b>36 (54,5%)</b>		x	x	
<b>M36I</b>	45		x	x		L63T	3				x
<b>M36V</b>	1		x			L63S	2				x
<b>M36L</b>	1		x			L63Q	2				x
<b>Total = 47 (88,7%)</b>						L63H	1				x
<b>H69K</b>	<b>40 (75,5%)</b>		x			L63V	1				x
H69Q	3				x	<b>Total = 47 (71,2%)</b>					
H69T	1				x	<b>E35D</b>	<b>26 (39,4%)</b>		x		
<b>Total = 44 (83%)</b>						<b>V77I</b>	<b>19</b>		x	x	
I13V	35				x	V77L	1				x
I13A	1				x	<b>Total = 20 (30,3%)</b>					
<b>Total = 36 (67,9%)</b>						I13V	18 (27,3%)				x
<b>K20I</b>	<b>26</b>		x			<b>I62V</b>	<b>16 (24,2%)</b>		x		
<b>K20R</b>	4		x	x		<b>R41K</b>	<b>14 (21,2%)</b>		x		
<b>K20R/M</b>	1		x	x		<b>M36I</b>	8		x	x	
<b>Total = 31 (58,5%)</b>						<b>M36L</b>	1		x		
<b>E35D</b>	<b>26</b>		x			M36T	1				x
E35Q	1				x	<b>Total = 10 (15,2%)</b>					
E35G	1				x	<b>A71V</b>	3		x	x	
E35K	1				x	<b>A71T</b>	6		x	x	
<b>E35N</b>	<b>1</b>		x			<b>Total = 9 (13,6%)</b>					
E35S	1				x	<b>L10I</b>	<b>6</b>		x	x	
<b>Total = 31 (58,5%)</b>						<b>L10V</b>	1		x	x	
<b>L63P</b>	<b>10</b>		x	x		<b>Total = 7 (10,6%)</b>					
L63S	4				x	<b>H69K</b>	<b>5</b>		x		
L63T	1				x	H69N	2				x
L63H	2				x	H69Y	1				x
L63Q	1				x	<b>Total = 8 (12,1%)</b>					
L63V	1				x	<b>K20R</b>	<b>3</b>		x	x	
L63C	1				x	<b>K20M</b>	1		x	x	
L63V/I	1				x	<b>Total = 4 (6%)</b>					
<b>Total = 21 (39,6%)</b>						<u>V82I</u>	1 (1,5%)				x
<b>L10V</b>	<b>7</b>		x			T74S	2				x
<b>L10I</b>	<b>8</b>		x	x		T74A	1				x
<b>L10V/I</b>	1		x			<b>Total = 3 (4,5%)</b>					
<b>Total = 16 (30,2%)</b>						<b>L33V</b>	1		x		
<b>I62V</b>	<b>5 (9,4%)</b>		x			<b>L33I</b>	1		x		
<u>V82I</u>	4 (7,5%)				x	<b>Total = 2 (3%)</b>					
<b>K45R</b>	<b>3 (5,7%)</b>		x			<b>D30N</b>	1 (1,5%)	x			
<b>L33F</b>	<b>2 (3,8%)</b>		x			<b>N88D</b>	1 (1,5%)	x			
I47M	1 (1,9%)				x	<b>M46L</b>	1 (1,5%)	x	x	x	
<b>Q58E</b>	<b>1 (1,9%)</b>		x			I47T	1 (1,5%)				x
<b>V77I</b>	<b>1 (1,9%)</b>		x	x	x	<b>K45R</b>	1 (1,5%)		x		
T74A	1 (1,9%)										



**Figure 36:** Codons présentant des mutations de polymorphisme impliquées dans la résistance aux IP : comparaison des sous-types B et non B

**Pour le sous-type B**, 89,4% des souches présentaient au moins une mutation secondaire tandis que 65,2% en présentaient au moins 2. Une souche de type B présente 2 mutations primaires, la N88D et la D30N : la patiente concernée a été contaminée par son mari qui recevait une trithérapie. Une autre souche présente une M46L dont l'origine n'est pas définie. En moyenne, une souche de type B présente 2 mutations secondaires sur la protéase.

**Pour les sous-types non B**, 100% des souches présentaient au moins 2 mutations secondaires et 88,5% en présentaient au moins 4. Le nombre de mutations préexistantes ne varie pas entre les sous-types non B, celui-ci est de 4 ou 5, plus rarement 6. Une souche de type non B présente en moyenne 4,3 mutations secondaires sur la protéase. Dans cette étude, 2 souches non B présentent seulement 2 mutations, toutes deux appartiennent au type D qui est

phylogénétiquement proche du type B. Les mutations 20, 36, 41 et 69 sont fortement représentées dans le groupe non B à l'inverse des mutations 63 et 77 que l'on retrouve plus fréquemment dans le groupe B. Seul un polymorphisme en position V82I implique un site de résistance primaire pour les sous-types non B ; 4 souches sont concernées, 2 appartiennent au sous-type G et 2 sont des formes recombinantes CRF14.

Le tableau XXVI répertorie 4 souches de type non B (7,5%) dont le profil de résistance induit une résistance possible au Tipranavir/Ritonavir (500/200 mg BID).

**Tableau XXVI: Souches de type non B dont les mutations de polymorphisme induisent une résistance possible au TPV/RTV selon l'algorithme 2005 de l'ANRS.**

<b>Patients (n°)</b>	<b>Sous-type</b>	<b>Mutations induisant une résistance possible au TPV/RTV</b>	<b>Autres mutations présentes</b>
<b>10</b>	A1	<b>L10V, I13V, M36I, H69K</b>	E35D, S37N, <b>R41K</b> , L89M
<b>14</b>	A1	<b>L10V, I13V, M36I, H69K</b>	T12I, L19Q, E35D, S37N, <b>R41K</b> , K45R, L63P, C67Y, L89M
<b>16</b>	A1	<b>L10V, I13V, M36I, H69K</b>	T12K, L19T/I, E35D, S37N, <b>R41K</b> , L89M
<b>50</b>	CRF06	<b>I13V, L33F, M36I, H69K</b>	K14V, I15V, G16E, K20I, S37D, P39S, <b>R41K</b> , L63V, K70R, L89M

**Le pourcentage de patients présentant une résistance ou une résistance possible à au moins une molécule de la famille des inhibiteurs de la protéase est de 3% pour le sous-type B (2 souches présentant au moins une résistance primaire) et de 7,5% pour les sous-types non B (4 souches présentant une résistance possible au TPV/RTV).**

### 2.2.1.2 Gène de la TI

Le tableau XXVII répertorie toutes les mutations de polymorphisme retrouvées sur le gène de la TI pour les patients naïfs dont la souche virale appartient au sous-type non B (N=38) et B (N=56). Comme pour la protéase, les mutations présentées touchent les codons habituellement responsables de résistances primaires ou secondaires décrites dans les algorithmes français.

**Tableau XXVII: Mutations de polymorphisme retrouvées sur les codons impliqués dans la résistance aux INTI et INNTI.**

<b>Sous-types non B : Codons impliqués dans la résistance aux analogues nucléosidiques et inhibiteurs nucléotidiques (N = 39)</b>						<b>Sous-type B : Codons impliqués dans la résistance aux analogues nucléosidiques et inhibiteurs nucléotidiques (N = 56)</b>					
Mutation	Nombre de séquences	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite	Mutation	Nombre de séquences	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite
T215S	1 (2,6%)		x	x		T215D	2 (3,6%)		x	x	
V106I	1				x	T215C	1		x	x	
L210V	1				x	T215S	1		x	x	
L210W	1		x	x		Total = 4 (7,1%)					
Total = 2 (5,1%)						K219Q	1		x		
K219Q	1 (2,6%)		x			K219R	1				x
D67N	1 (2,6%)		x	x		Total = 2 (3,6%)					
						M41L	5 (8,9%)		x	x	

<b>Codons impliqués dans la résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques (N = 38)</b>						<b>Codons impliqués dans la résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques (N = 56)</b>					
Mutation	Nombre de séquences	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite	Mutation	Nombre de séquences	Résistance primaire	Résistance secondaire	Résistance possible	Non décrite
K101E	1 (2,6%)	x				K103N	2(3,6%)	x			
K103R	2 (5,1%)				x	K103S	1 (1,8%)	x			
						Total = 3 (5,4%)					
						K101R	1 (1,8%)				x
						K101Q	1 (1,8%)				x
						Total = 2 (3,6%)					
						V106I	2 (3,6%)				x
						V106L	1 (1,8%)				x
						Total = 3 (5,4%)					

**Pour les souches de type B**, 6 patients (10,7%) présentent au moins 1 mutation secondaire responsable de la résistance aux INTI. Trois patients présentent une résistance croisée à tous les INNTI (5,4%) du fait de mutations au niveau du codon 103. Un patient présente à la fois une résistance majeure à tous les INNTI et au moins une résistance secondaire aux INTI (1,8 %). La séquence codant pour la TI de la patiente présentant les 2 mutations primaires sur la protéase (N88D et D30N), montre une mutation secondaire, la T215S.

**Tableau XXVIII : Patients dont la souche virale de type B présente des mutations au niveau de codons impliqués dans la résistance aux INNTI et/ou INTI**

<b>Patients (n°)</b>	<b>Mutations</b>
<b>1</b>	<b>M41L</b>
<b>2</b>	<b>K219Q, D67N</b>
<b>3</b>	<b>M41L, T215D</b>
<b>4</b>	<b>M41L, K103N, T215C</b>
<b>5</b>	<b>M41L, T215D</b>
<b>6</b>	<b>K103S, K219R</b>
<b>7</b>	<b>K103N</b>
<b>8</b>	<b>T215S</b>

**Pour les souches de type non B**, un patient (2,6%) présente une mutation primaire (K101E) responsable d'une résistance croisée à tous les INNTI : il s'agit d'un des 3 patients dont la souche virale est classée CRF07 sur la protéase et B sur la TI. A celle-ci est associée une mutation sur le codon 103 non décrite dans la résistance aux INNTI (K103R) et une T215S. La K103R est retrouvée isolément chez un autre des 3 patients CRF07/B. Une souche virale appartenant au sous-type CRF02, présente une D67N associée à une K219Q. Pour les souches de type non B, si on considère uniquement les mutations impliquées dans la résistance aux INTI, 3 patients (7,7%) présentent au moins une mutation secondaire.

**Tableau XXIX: Profil de mutations des patients dont la souche virale de type non B présente des mutations au niveau de codons impliqués dans la résistance aux INNTI et/ou INTI**

<b>Patients (n°)</b>	<b>Sous-type</b>	<b>Mutations</b>
<b>34</b>	CRF02	<b>D67N, K219Q</b>
<b>51</b>	CRF06	V106I
<b>66</b>	D	<b>L210W</b>
<b>81</b>	CRF07/B	L210V
<b>82</b>	CRF07/B	K103R
<b>85</b>	CRF07/B	<b>K101E, K103R, T215S</b>

**Tableau XXX: Prévalence de la résistance aux INTI et INNTI dans la cohorte de patients nantais naïfs.**

	<b>% de patients naïfs présentant une résistance et/ou une résistance possible à au moins un INTI</b>	<b>% de patients naïfs présentant une résistance et/ou une résistance possible à au moins un INNTI</b>
<b>Sous-type B</b>	<b>7,1% (4/56)</b>	<b>5,4% (3/56)</b>
<b>Sous-types non B</b>	<b>2,6% (1/39)</b>	<b>2,6% (1/39)</b>

## 2.2.2 Codons non impliqués dans la résistance aux antirétroviraux

### 2.2.2.1 Gène de la protéase

**Tableau XXXI : Mutations de polymorphisme retrouvées sur le gène de la protéase et non impliquées dans la résistance aux IP.**

Sous-types non B : codons présentant des mutations sans résistances décrites (N=53)					
Mutation	Nombre de séquences	Mutation	Nombre de séquences	Mutation	Nombre de séquences
S37N	40	I64V	3	I93L	5
S37D	9	I64M	5	I93V	1
S37N/D	1	I64L	1		<b>Total = 6 (11,3%)</b>
	<b>Total=50 (94,3%)</b>		<b>Total = 9 (17%)</b>	C67E	4
L89M	46	R57K	9 (17%)	C67Y	1
L89V	1	G16E	8		<b>Total = 5 (9,4%)</b>
	<b>Total=47 (88,7%)</b>	G16A	1	D60S	1
K14R	22		<b>Total = 9 (17%)</b>	D60E	3
K14V	1	L19P	3		<b>Total = 4 (7,5%)</b>
	<b>Total=23 (43,4%)</b>	L19I	2	G17E	4 (7,5%)
I15V	15	L19Q	1	Q18Y	2
I15L	1			Q18H	1
	<b>Total=16 (30,2%)</b>	L19K	1		<b>Total = 3 (5,7%)</b>
K70R	12		<b>Total = 7 (13,2%)</b>	K43R	3 (5,7%)
K70Q	1	Q61E	2	P79H	1
	<b>Total=13 (24,5%)</b>	Q61N	3	P79D	1
T12S	2	Q61H	2		<b>Total = 2 (3,8%)</b>
T12V	2		<b>Total = 7 (13,2%)</b>	E34A	1 (1,9%)
T12K	4	I72V	2	L38I	1 (1,9%)
T12P	1	I72T	2	P39S	1 (1,9%)
T12A	1	I72M	1	E65D	1 (1,9%)
T12I	1		<b>Total = 5 (9,4%)</b>	I85V	1 (1,9%)
	<b>Total=11 (20,8%)</b>			F99L	1 (1,9%)

Sous-type B : codons présentant des mutations sans résistances décrites (N=66)					
Mutation	Nombre de séquences	Mutation	Nombre de séquences	Mutation	Nombre de séquences
S37N	30	T12S	2	G16A	1
S37T	6	T12A	2	G16E	1
S37D	6	T12V/A	2		<b>Total = 2 (3%)</b>
S37E	5	T12P	1	P39S	1 (1,5%)
S37K	1		<b>Total = 7 (10,6%)</b>	Q18K	1 (1,5%)
S37P	1	R57K	5 (7,6%)	K43R	1 (1,5%)
S37A	1	L19I	2	Q92K	1 (1,5%)
	<b>Total=50 (75,8%)</b>	L19V	1		
I64V	18	L19Q	1		
I64L	4	L19M	1		
	<b>Total=22 (33,3%)</b>		<b>Total = 5 (7,6%)</b>		
I93L	16 (24,2%)	E65D	2		
I15V	13 (19,7%)	E65K	1		
I72V	5		<b>Total = 3 (4,5%)</b>		
I72T	4	K70R	2 (3%)		
	<b>Total = 9 (13,6%)</b>				
K14R	8 (12,1%)				

## 2.2.2.2 Gène de la TI

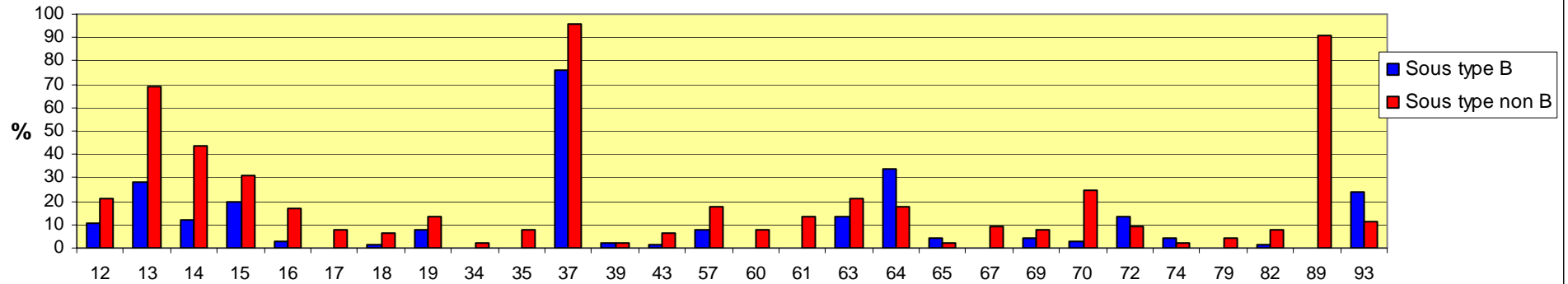
**Tableau XXXII : Mutations de polymorphisme retrouvées sur le gène de la TI et non impliquées dans la résistance aux INTI ou INNTI.**

<b>Sous-types non B: codons présentant des mutations sans résistances décrites (N=38)</b>							
Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences
Q207E	18	I135V	12	K49R	<b>7 (18,4%)</b>	E138A	2 (5,3%)
Q207A	11	I135T	6	I202V	5	E169D	1
Q207K	3	I135L	4	I202L	1	E169K	1
Q207D	1	I135K	1	<b>Total = 6 (15,8%)</b>		<b>Total = 2 (5,3%)</b>	
Q207G	1	I135T/R	1	K43R	2	D192A	1
Q207J	1	<b>Total = 24 (63,2%)</b>		K43E	3	D192V	1
Q207P	1	E122K	16	<b>Total = 5 (13,2%)</b>		<b>Total = 2 (5,3%)</b>	
<b>Total = 36 (94,7%)</b>		E122G	1	K32E	1	E194K	1
V35T	26	E122M	1	K32N	1	E194D/V	1
V35P/T	3	E122I	1	K32I	1	<b>Total = 2 (5,3%)</b>	
V35I	3	E122P	1	K32R	1	R206G	2 (5,3%)
V35E	1	<b>Total = 20 (52,6%)</b>		K32?	1	F214L	2 (5,3%)
<b>Total = 33 (86,8%)</b>		D123S	7	<b>Total = 5 (13,2%)</b>		I47L	1 (2,6%)
K173T	12	D123N	5	K30E	2	Y56S	1 (2,6%)
K173A	8	D123E	4	K30?	2	N57H	1 (2,6%)
K173I	4	D123T	1	<b>Total = 4 (10,5%)</b>		K126Q	1 (2,6%)
K173S	4	D123N/S	1	V179I	2	I132V	1 (2,6%)
K173R	2	<b>Total = 18 (47,4%)</b>		V179E	1	I142V	1 (2,6%)
K173L	1	S162A	10	V179?	1	Q145V	1 (2,6%)
K173V/T	1	S162C	7	<b>Total = 4 (10,5%)</b>		Y146S	1 (2,6%)
<b>Total = 33 (86,8%)</b>		S162Y	1	G196E	3 (7,9%)	Q161P	1 (2,6%)
D177E	30	<b>Total = 18 (47,4%)</b>		K104R	2	A158S	1 (2,6%)
D177Q	1	I178M	9	K104N	1	P170S	1 (2,6%)
<b>Total = 31 (81,6%)</b>		<b>Total = 3 (7,9%)</b>		<b>Total = 3 (7,9%)</b>		R172K	1 (2,6%)
Q174K	26	I178L	4	E40D	2 (5,3%)	Y183S	1 (2,6%)
Q174R	4	I178V	1	V90I	2 (5,3%)	I195L	1 (2,6%)
Q174A	1	<b>Total = 14 (36,8%)</b>		A98S	1	H198P	1 (2,6%)
<b>Total = 31 (81,6%)</b>		V60I	13 (34,2%)	A98G	1	E204D	1 (2,6%)
T200A	21	T39K	4	<b>Total = 2 (5,3%)</b>		K220R	1 (2,6%)
T200I	2	T39L	2	I50V	2 (5,3%)	F171Y	1 (2,6%)
T200E	2	T39A	2	S68G	2 (5,3%)	T165I	1 (2,6%)
T200R	1	T39M	1	D121H	2 (5,3%)		
<b>Total = 26 (68,4%)</b>		T39N	1	T139V	1		
R211K	16	T39P	1	T139S	1	<b>Total = 2 (5,3%)</b>	
R211S	7	T39M/I	1	V189L	1		
R211E	1	T39N/Y	1	V189I	1	<b>Total = 2 (5,3%)</b>	
R211G	1	<b>Total = 13 (34,2%)</b>		<b>Total = 2 (5,3%)</b>			
<b>Total = 25 (65,8%)</b>		E36D	8 (21,1%)				

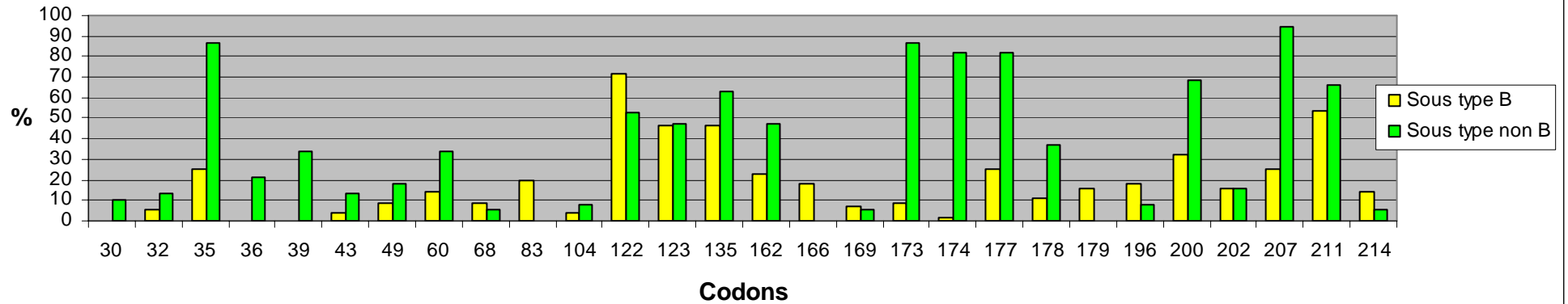
<b>Sous-type B: codons présentant des mutations sans résistances décrites (N=56)</b>								
Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences	Mutations	Nombre de séquences	
E122K	<b>40 (71,4%)</b>	Q207H	4	E169D	<b>4 (7,1%)</b>	I50V	<b>1 (1,8%)</b>	
R211K		24	Q207R	4	K32N	<b>3 (5,4%)</b>	N54T	<b>1 (1,8%)</b>
R211G		3	Q207E	2	T39A	2	V75L	<b>1 (1,8%)</b>
R211S		1	Q207P	1	T39L	1	K70R	<b>1 (1,8%)</b>
R211E		1	Q207K	1	<b>Total = 3 (5,4%)</b>		D67N	<b>1 (1,8%)</b>
R211A		1	Q207G	1	K64R	<b>3 (5,4%)</b>	E79V	<b>1 (1,8%)</b>
<b>Total = 30 (53,6%)</b>		Q207N/H	1	A98S	<b>3 (5,4%)</b>	K82R	<b>1 (1,8%)</b>	
D123E	21	<b>Total = 14 (25%)</b>		Q197H	<b>3 (5,4%)</b>	Q85P	<b>1 (1,8%)</b>	
D123N	4	S162C	11	T165I	2	W88G	<b>1 (1,8%)</b>	
D123G	1	S162Y	1	T165P	1	V90I	<b>1 (1,8%)</b>	
<b>Total = 26 (46,4%)</b>		S162G	1	<b>Total = 3 (5,4%)</b>		Q91H	<b>1 (1,8%)</b>	
I135T	11	<b>Total = 13 (23,2%)</b>		V106I	2	T69S	<b>1 (1,8%)</b>	
I135V	4	R83K	<b>11 (19,6%)</b>	V106L	1	K102Q	<b>1 (1,8%)</b>	
I135R	4	K166R	9	<b>Total = 3 (5,4%)</b>		V108I	<b>1 (1,8%)</b>	
I135M	3	K166I	1	E138A	2	S117P	<b>1 (1,8%)</b>	
I135L	1	<b>Total = 10 (17,9%)</b>		E138K	1	V118I	<b>1 (1,8%)</b>	
<b>Total = 23 (46,4%)</b>		G196E	<b>10 (17,9%)</b>	<b>Total = 3 (5,4%)</b>		Y127N	<b>1 (1,8%)</b>	
T200A	11	I202V	<b>9 (16,1%)</b>	K43N	<b>2 (3,6%)</b>	Y144F	<b>1 (1,8%)</b>	
T200I	3	V179I	7	K104R	1	Q145K	<b>1 (1,8%)</b>	
T200V	2	V179D	2	K104T	1	Y146S	<b>1 (1,8%)</b>	
T200S	1	<b>Total = 9 (16,1%)</b>		<b>Total = 2 (3,6%)</b>		K154E	<b>1 (1,8%)</b>	
T200P	1	F214L	<b>8 (14,3%)</b>	I142T	<b>2 (3,6%)</b>	R172K	<b>1 (1,8%)</b>	
<b>Total = 18 (32,1%)</b>		V60I	<b>8 (14,3%)</b>	A158S	<b>2 (3,6%)</b>	Q174K	<b>1 (1,8%)</b>	
V35I	8	I178M	3	S162A	<b>2 (3,6%)</b>	G190A	<b>1 (1,8%)</b>	
V35T	3	I178V	2	R206S	1	D192A	<b>1 (1,8%)</b>	
V35K	1	I178L	1	R206G	1	E194G	<b>1 (1,8%)</b>	
V35L	1	<b>Total = 6 (10,7%)</b>		<b>Total = 2 (3,6%)</b>		E203G	<b>1 (1,8%)</b>	
V35E	1	K173E	3	P226T	1	H208R	<b>1 (1,8%)</b>	
<b>Total = 14 (25%)</b>		K173R	1	P226S	1	Q222R	<b>1 (1,8%)</b>	
D177E	11	K173T	1	<b>Total = 2 (3,6%)</b>		K223E	<b>1 (1,8%)</b>	
D177N	2	<b>Total = 5 (8,9%)</b>		V189I	<b>2 (3,6%)</b>			
D177G	1	K49R	<b>5 (8,9%)</b>	E204D	<b>2 (3,6%)</b>			
<b>Total = 14 (25%)</b>		S68G	<b>5 (8,9%)</b>	E36D	<b>1 (1,8%)</b>			

Les figures 37 a et b illustrent les 3 tableaux précédents en reprenant les principales mutations rencontrées. Certaines positions, connues pour présenter des mutations secondaires ou primaires, comme la 63 ou la 82 pour la protéase, sont le théâtre d'autres mutations non décrites dans la résistance aux antirétroviraux ; elles apparaissent dans ces 2 figures.

*Figure 37 a: Gène de la protéase*



*Figure 37 b: Gène de la TI*



*Figure 37 a et b : Codons présentant des mutations de polymorphisme non impliquées dans la résistance aux antirétroviraux*

Sur le gène de la protéase, la mutation au codon 89 est présente dans 90% des séquences de type non B et n'est jamais représentée dans le sous type B. A noter que parmi les 5 souches de type non B ne présentant pas cette mutation on retrouve 2 souches de type D et les 3 souches classées CRF07 sur la protéase et B sur la TI. Sur le gène de la TI, les mutations aux positions 35, 36, 39, 173, 174, 177, 200 sont plus fréquemment rencontrées pour les souches de type non B.

# **DISCUSSION**

## **Conséquence de la variabilité du VIH sur le géotypage.**

Dans la 1<sup>ère</sup> partie de cette thèse, nous avons vu qu'il était logiquement plus difficile d'amplifier le gène de la TI des souches de type non B pour des charges virales comprises entre 200 et 10000 (tableau VI et VII). Par ailleurs, le tableau VI montre que pour des charges virales <200 il est possible d'amplifier le gène de la protéase et de la TI pour respectivement, 63 et 43% des échantillons. Il est vraisemblable que la charge virale mesurée pour certains patients dont la souche virale est de type non B soit sous estimée, voire indétectable ; en effet, ces kits présentent des amorces d'amplification qui ne sont pas capables de reconnaître avec la même efficacité tous les sous-types de VIH-1.

Le fait d'utiliser des amorces spécifiques du sous-type J et CRF11 nous a permis d'amplifier et de séquencer le gène de la TI pour un de nos patients dont la charge virale était proche de 10000. Ceci montre bien qu'il existe une diminution de capacité d'hybridation des amorces pour des charges virales basses et qu'il est possible de contourner cette difficulté. L'analyse ultérieure de l'organisation génomique des formes recombinantes, nous a montré qu'il aurait été plus pertinent de fabriquer des amorces spécifiques des sous-types J, CRF11 et CRF13 afin d'amplifier le gène de la TI des 4 autres patients.

Pour optimiser la technique de séquençage, il faudrait synthétiser des couples d'amorces consensus de tous les sous-types, ceci n'est pas réalisable en pratique, les points de mutation étant trop nombreux et répartis sur tout le génome. Par contre, il serait intéressant et tout à fait envisageable d'utiliser, dans la même réaction, plusieurs couples d'amorces spécifiques d'un sous-type ou d'un groupe de sous-types (amorces spécifiques du groupe A et apparentés, du groupe G et apparentés etc...); ceci nécessitant bien sur de redéfinir les conditions expérimentales.

## **Problème du typage : quel méthode choisir ? Perspectives.**

L'organisation génomique des formes recombinantes CRF01 à CRF16 montre à quel point il est difficile de classer une souche virale en tel ou tel sous-type à la seule analyse d'une partie du gène *pol* (protéase et TI). En effet, celle-ci n'est pas représentative du génome global. C'est ce dernier point qui explique les discordances de sous-type entre l'analyse phylogénétique de la TI et celle de la protéase évoquées dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette thèse. De nombreuses études ont montré les discordances existantes entre les différentes méthodes de typage des souches virales du VIH 1 (Cane, Aitkin et al. 2004) (Peeters, Esu-Williams et al. 2000). La technique de séquençage reste la méthode de référence ; la plupart des données épidémiologiques sur les sous-types du VIH-1 sont basées sur l'analyse phylogénétique d'une partie du gène *env* codant pour la gp41, du fait de sa grande variabilité ; mais tout comme la TI ou la protéase, elle ne représente qu'une partie du génome. L'idéal serait de disposer du génome complet afin d'obtenir un typage cohérent ; malheureusement, ceci est irréalisable en routine du fait de la lourdeur et du coût de ce type d'examen. Dans notre étude nous proposons de typer les souches virales sur la séquence reconstituée protéase + TI du gène *pol*, dans l'optique d'une analyse globale de ce gène ; cette question est d'ailleurs en réflexion au sein du groupe de recherche de l'ANRS.

Depuis 1992, 16 formes recombinantes ont été décrites et la liste risque de s'allonger ces prochaines années. Face à l'émergence de ces nouvelles formes et l'évolution continue de la classification, il semble nécessaire d'élaborer au niveau international une méthode consensuelle de typage des souches virales du VIH-1 ; en effet, l'analyse de la littérature à ce sujet montre que les méthodes utilisées varient énormément selon les équipes de recherche. Par ailleurs, il paraît indispensable de réactualiser et corriger continuellement les banques de données en y incluant de nouvelles séquences de référence.

De plus, le développement de nouvelles approches simples et peu onéreuses restent à développer pour la détermination des sous-types, en effet tous les laboratoires

n'ont pas accès aux techniques de séquençage. Quelques innovations ont été présentées ces derniers mois : Wei M. et al ont mis au point en 2004 une technique de nested PCR ne nécessitant pas d'étape de séquençage pour la détermination du sous-type ; ils se sont basés sur le fait que 5 sous-types (B, C, CRF01-AE, CRF07-BC et CRF08-BC) représentaient plus de 90% des formes circulantes en chine ; à partir de ces données, ils ont développé une nested PCR spécifique à chaque sous-type, grâce à 5 couples d'amorces différents. La détermination du sous-type se fait en mesurant la taille des fragments obtenus (région *gag*) après migration sur gel d'agarose (Wei, Guan et al. 2004).

Schroeder TL et al. ont eux développé une technique basée sur le modèle de l'HMA pour caractériser les formes recombinantes ; le « nonradioactive heteroduplex tracking assay » utilise des sondes ciblées sur 7 régions différentes du génome afin d'obtenir une représentation globale de celui-ci (Schroeder, Burger et al. 2005).

### **Augmentation de la prévalence des sous-types non B à Nantes : évolution de la cohorte de patients ? Existence de facteurs de virulence ?**

Dans cette étude, nous avons observé une augmentation significative de la prévalence des sous-types non B depuis 1997 ; en effet, elle était de 15 % en 1996, 33% l'année suivante pour progressivement arriver à 46% en 2004. Au sein de ces souches, une grande diversité est observée, mais ce sont les sous-types A et apparentés (CRF01, CRF02, CRF15) qui prédominent (49,5%). Une étude stéphanoise, évaluant la prévalence des sous-types non B de 1984 à 2003, confirme cette tendance en soulignant que plus de 40% des nouveaux cas d'infection par le VIH-1 recensés dans la région stéphanoise sont en relation avec des souches de type non B et ce, depuis 1998. En outre, une forte proportion de sous-type A et apparentés a aussi été retrouvée (Granjean, Bourlet et al. 2005).

L'augmentation rapide de la prévalence des sous-types non B suggère que ces formes présentent probablement des facteurs favorisant de transmission au sein de la population. Plusieurs études se sont intéressées au tropisme cellulaire du virus en

fonction des sous-types à travers l'étude de la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120. Il a été montré par exemple, qu'il existait, une grande variabilité des acides aminés de la boucle V3 des souches de type D contrairement au sous type C (Peeters and Delaporte 1999). Des expériences *in vitro* rapportent une réplication plus importante des isolats C et E dans les cellules de Langerhans, cellules cibles de la transmission hétérosexuelle (Soto-Ramirez, Renjifo et al. 1996). Dans notre étude, le mode principal de transmission des souches non B se révèle être hétérosexuel ; pour autant il est difficile d'en déduire des données sur les capacités différentes de transmission de certains sous-types : en effet, la majorité des patients infectés par des souches de type non B sont d'origine africaine (50%), continent où les facteurs culturels et sociaux sont complexes. Du fait du caractère multifactoriel de la transmission du VIH, l'influence d'un sous-type particulier reste donc difficile à démontrer (Piot, Bartos et al. 2001). Quelques études suggèrent une différence de progression de la maladie selon les sous-types : Kanki et al. ont montré en 1999, que les souches de type A et G semblaient conférer aux patients une meilleure évolution au niveau clinique contrairement à ceux dont la souche est de type C (Kanki, Hamel et al. 1999). Par ailleurs, dans une étude récente, le sous-type D est associé à des taux de CD4 plus bas et à une progression plus rapide vers le stade SIDA comparé aux souches de type A (Kaleebu, French et al. 2002).

La désignation des sous-types est un marqueur moléculaire puissant pour suivre l'évolution de l'épidémie du VIH-1 ; du fait des mutations et recombinaisons fréquentes survenant dans le génome et des mouvements importants de population favorisant la cocirculation de nombreux sous-types différents, il se peut que les sous-types « originaux » décrits initialement soient amenés à disparaître pour être remplacés progressivement par des formes recombinantes circulantes qui elles mêmes pourront recombiner entre elles ou avec d'autres sous-types.

## **Résistance thérapeutique chez des patients naïfs de la cohorte nantaise: influence du polymorphisme des souches virales de type non B.**

L'analyse des séquences codant pour la protéase des souches de type non B a montré qu'il existe un polymorphisme naturel au niveau des codons impliqués dans la résistance aux antirétroviraux, avec des substitutions d'acides aminés au niveau de sites secondaires de résistance. Au niveau des sites primaires, la mutation V82I est présente chez 100% des souches virales de type G et CRF14. Les mutations de polymorphisme touchant des sites impliqués dans la résistance aux INNTI ou INTI sont moins fréquentes que ce soit pour les sous-types B ou non B.

L'influence de la variabilité des sous-types sur la réponse virologique et le risque d'échappement thérapeutique sont sujets à controverse. Il n'y a pas de preuves nettes que la réponse virologique et la résistance aux antirétroviraux varient selon les sous-types et, pour certains auteurs, la susceptibilité aux IP des sous-types non B semble préservée malgré l'existence d'un polymorphisme naturel aux sites responsables de mutations secondaires (Frater, Beardall et al. 2001) (Frater, Dunn et al. 2002) (Turner, Roldan et al. 2004). Des tests de sensibilité *in vitro* des sous-types non B vis-à-vis des IP ont été mis en œuvre par Holguin et al. en 2004 ; ces tests ne montrent pas de différences significatives de sensibilité des sous-types non B par rapport au sous-type B : sur 58 souches testées, (dont 40% appartiennent aux sous type G), 2 souches de type G présentent une sensibilité diminuée aux IP (Holguin, Paxinos et al. 2004).

D'autres études, montrent que la présence d'un nombre élevé de mutations aux positions associées aux résistances médicamenteuses pourrait influencer le risque ultérieur d'échappement (Loemba, Brenner et al. 2002) (Lorenzi, Opravil et al. 1999) (Perez, Rose et al. 2001). Van de Vijver montre, comme nous, qu'il existe une plus grande variabilité au niveau des positions de mutations mineures de résistance pour les sous-types non B par rapport au sous-type B et que ceci impacte la sensibilité aux différents IP : les sous-types non B portent plus souvent des

mutations mineures associées à la résistance de l'IDV, du NFV, de l'ATV et du RTV. Dans le cas des souches de type B, la sensibilité du SQV et du LPV/r est plus souvent réduite. (Wensing, van de Vijver et al. 2005). Dans notre étude et selon l'algorithme français de l'ANRS de juillet 2005, nous avons vu que le polymorphisme rencontré sur le gène de la protéase des sous-types non B, pouvait donner lieu à une résistance possible au TPV/RTV (4 souches sur 52) ; reste à savoir si cette résistance existe réellement *in vivo*. A noter, qu'en utilisant l'algorithme 2004 de l'ANRS, ces 4 souches ne présentent pas cette résistance.

Shafer et al. (1997) ont décrit une susceptibilité différente vis-à-vis des INTI pour le sous-type C (Shafer, Eisen et al. 1997). Des résultats controversés existent pour le sous-type F (Apetrei, Descamps et al. 1998) (Tanuri, Vicente et al. 1999). Pour Descamps et al. (1998), il existe dans le sous-type G, une différence de sensibilité vis-à-vis des IP du fait de son polymorphisme à la position 82 (V82I retrouvée chez 100% des sous types G) (Descamps, Apetrei et al. 1998). En 2002, Kempf et al. vont dans ce sens en suggérant que le polymorphisme associé aux positions 20, 36 et 82 sur la protéase, influenceraient la réponse virologique au lopinavir (Kempf, Isaacson et al. 2002).

En 1999, Lorenzi et al. considèrent que les mutations aux positions 10 et 36 sont de forts prédicateurs d'échec virologique car elles sont toutes les deux retrouvées chez près de 40% des sujets naïfs ayant échappé ultérieurement à une ligne de traitement par IP (Lorenzi, Opravil et al. 1999).

Bocket et al. se sont intéressés en 2005 à l'impact des différents sous-types du VIH-1 sur l'efficacité d'une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement. Aucune différence entre le groupe de patients de souches virales non B et B n'a été montrée que ce soit au niveau du temps d'indélectabilité de la charge virale, de la progression clinique ou encore de l'évolution des lymphocytes CD4 (Bocket, Cheret et al. 2005). Une autre étude présentée par Kantor, compare l'adéquation entre les molécules recommandées en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement et le sous-type viral chez 379 patients en échec d'une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement et infectés par différents sous-types (A, B, C, D, F, G et CRF01-AE) ; des mutations de résistance affectant les INTI de 2<sup>ème</sup> ligne

sont détectées de façon significativement plus fréquente pour les sous-types A, C, D et G laissant potentiellement prévoir une moindre efficacité de la combinaison de 2<sup>ème</sup> ligne pour le 1<sup>er</sup> groupe de sous-types (INTI recommandés en 2<sup>ème</sup> ligne : ABC, TDF, ou ddi) (Kantor, Katzenstein et al. 2005).

Brenner et al. ont montré que l'acquisition d'une mutation au niveau d'un codon de résistance peut différer selon les sous-types. Cela s'explique par le fait que certains polymorphismes sont le fait de mutations silencieuses. Selon la base variable, les évènements de substitution qui conduiront à la mutation peuvent être plus ou moins complexes, pouvant faciliter ou au contraire rendre plus difficile l'acquisition de résistance. Par exemple, en position V106 de la TI, il faut 2 évènements de substitution pour acquérir une mutation de résistance pour un sous-type B (V106M : mutation rare) et un seul pour un sous-type C (Brenner, Turner et al. 2003).

### **Résistance thérapeutique chez des patients naïfs de la cohorte nantaise : transmission de souches virales résistantes de type B et non B.**

Parmi les souches virales étudiées, des mutations conférant une résistance primaire aux INNTI ont été mises en évidence chez des patients n'ayant jamais reçu d'INNTI (une K101E pour une souche non B, une K103S et 2 K103N pour les souches de type B). Aucune notion de contamination par un patient déjà traité n'a été retrouvée. En 2004, Akinsete et al ; ont décrit 3 patients africains dont la souche virale, de type CRF01-AE pour l'un et A pour les 2 autres, présentait une K103N avant la mise en oeuvre d'une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement (Akinsete, Hirigoyen et al. 2004).

Dans notre cohorte de sous-types non B, un patient naïf présente une souche virale possédant 2 TAMs, la D67N et la K219Q ; en 2004, Garcia-Lerma et al. ont répertorié chez des patients non traités des souches virales de type B présentant ce même profil ; des études réalisées in vitro sur des souches présentant la D67N

et/ou la K219Q ont montré qu'elles acquièrent plus rapidement des résistances à l'AZT par rapport aux souches sauvages du fait d'une meilleure capacité répliquative du virus en présence de cette molécule (Garcia-Lerma, MacInnes et al. 2004).

De nombreuses études rétrospectives ont été mises en œuvre à travers le monde pour évaluer la prévalence des virus résistants (Wensing and Boucher 2003) (Harzic, Pellegrin et al. 2002) (de Mendoza, del Romero et al. 2002) (Girardi 2003) (Delaugerre, Morand-Joubert et al. 2004). Le problème de la transmission de virus résistants a été longuement abordé cette année lors du 3<sup>ème</sup> Workshop Européen. A travers toutes les études présentées, il a été montré que la prévalence des virus résistants chez les sujets nouvellement infectés varie selon les régions, le type de population étudié mais aussi selon les méthodes utilisées pour mesurer la résistance. En Europe, les taux de résistance varient selon les pays : un taux de 4% est retrouvé en Espagne et en Slovénie tandis que l'Allemagne et la Belgique affichent des taux proches de 20%. En Afrique, où les thérapeutiques antirétrovirales sont moins répandues, les taux sont logiquement plus bas : par exemple, 3% de virus résistants ont été retrouvés au Burkina Faso et au Cameroun (compte-rendu du 3<sup>ème</sup> workshop européen disponible à l'adresse : <http://www.hivpresentation.com> ).

Une grande étude européenne (CATCH) a été effectuée sur 1633 patients nouvellement infectés entre 1996 et 2002 en Europe (excepté la France et la Grande-bretagne) ; des résistances primaires ont été détectées pour 9,6% des patients. En considérant chaque classe médicamenteuse, les mutations associées aux résistances aux INTI sont retrouvées pour 6,9% des patients, celles associées aux INNTI pour 2,6% et enfin les mutations primaires associées aux IP sont retrouvées pour 2,2% des malades. (Van de Vijver 2003).

En 2005, une étude européenne réalisée sur 2208 malades naïfs récemment ou chroniquement infectés entre 1996 et 2002 montre qu'un patient sur 10 présente une souche virale présentant une sensibilité diminuée aux antirétroviraux après analyse génotypique ; l'intérêt de cette étude est qu'elle prend en compte les différents sous types : 12,9% des souches de type B sont concernées contre 4,8%

pour les souches de type non B. Cette différence vient probablement du fait que ce sont les souches de type B qui sont le plus exposées aux thérapeutiques antirétrovirales ; cependant, même si la prévalence des souches virales résistantes de type non B reste inférieure à celle des sous-types B, elle ne cesse d'augmenter chez les patients nouvellement infectés entre 1996 et 2001 (Wensing, van de Vijver et al. 2005).

Aux Etats Unis, une équipe de San Fransisco, s'est intéressée à la transmission de virus résistants entre 1996 et 2001 : la résistance phénotypique aux INNTI est passé de 0 à 10%, celle aux IP de 2,6 à 6,2% (Grant, Hecht et al. 2002). Une diminution de la prévalence de virus résistant au INTI a été observée dans cette étude (21% en 1996 à 6,2% en 2001), cette tendance a été confirmée dans une étude new-yorkaise où le pourcentage passe de 8,3% pendant la période allant de 1995 à 1998 à 2,7% entre 1999 et 2001. Cette décroissance a été attribuée à la diminution du nombre de patients dont la souche virale est résistante à la 3TC (Simon, Vanderhoeven et al. 2002).

Il semble qu'en Amérique du Nord, parmi les 4 classes d'antirétroviraux, la prévalence des mutations de résistance chez les patients naïfs soit souvent supérieure pour les INNTI. Le taux de résistances primaires aux INNTI a été retrouvé pour près de 16% des patients dans certaines populations américaines (Salomon, Wainberg et al. 2000) (Little, Holte et al. 2002). Les résultats de ces études sont présentés sur le site [www.aidsmap.com](http://www.aidsmap.com).

En France, une étude sur la surveillance de la fréquence des résistances génotypiques aux antirétroviraux a été réalisée chez des patients inclus au moment de la primo-infection (étude PRIMO) au cours des années 2001-2002 (296 patients) et d'autre part chez 379 patients chroniquement infectés et non traités (étude ODYSSEE) . Ces études n'ont pas montré d'augmentation significative de cette prévalence par rapport aux années précédentes. Par ailleurs, les patients récemment infectés présentent plus fréquemment des souches résistantes comparés aux sujets qui le sont chroniquement (Descamps, Chaix et al. 2005).

## **Conséquences de la transmission de virus résistants.**

Hormis les études épidémiologiques sur la transmission des virus résistants, de nombreux chercheurs s'intéressent aux conséquences de ce phénomène. Il a été montré notamment que pour les virus résistants, il n'existait pas de différence de transmissibilité chez des patients contaminés par voie sexuelle ou IV (Salomon, Wainberg et al. 2000).

Par ailleurs, ce n'est pas parce qu'une souche résistante est prédominante dans le sang que la personne contaminée recevra cette souche ; en effet, une souche présente dans le liquide séminal peut très bien être sauvage contrairement à celle prédominante dans le sang et vice versa (Johnson, Petropoulos et al. 2001) (De Pasquale, Leigh Brown et al. 2003). Bhaskaran et al. ont montré que les taux de perte des CD4+ chez des patients infectés par des souches sauvages ou résistantes étaient similaires en l'absence de traitement (Bhaskaran, Pillay et al. 2004). En 2005, Chaix et al. se sont intéressés, à travers une étude rétrospective, à la réponse thérapeutique (traitement par HAART) de patients naïfs porteurs de virus résistants à au moins une molécule de leur traitement antiviral. Les résultats montrent que chez ces patients, la réponse au traitement empirique par HAART est impactée par ces mutations : à 3 mois, le pourcentage de patients présentant une charge virale indétectable (<400) est de 63% vs 82% dans le groupe contrôle, le suivi virologique à 6 mois confirme ces résultats (Chaix and Ghosn 2005).

Lors du congrès à Québec en juin 2005, Van de Vijver rapporte le taux de transmission de virus résistants en fonction de la capacité répliquative du virus : les virus porteurs de résistance multi-classes seraient moins fréquemment transmis, ce qui pourrait s'expliquer par une capacité répliquative altérée. Des conclusions comparables sont faites par l'équipe de Leigh Brown (Leigh Brown, Frost et al. 2004).

## **Conclusion**

Devant l'augmentation constante de la prévalence des sous-types non B dans les pays développés, le nombre d'études sur leur polymorphisme, la réponse virologique et/ou immunologique sous antirétroviraux et la transmission de virus résistants ne cesse de croître. Quelques études présentent des souches de type non B dont la susceptibilité est diminuée vis-à-vis d'une ou plusieurs classes de molécules (Deshpande, Recordon-Pinson et al. 2004) (Holguin, Paxinos et al. 2004) : en général, ces observations sont limitées à quelques souches isolées et ne sont pas généralisables à un sous-type particulier. Seules les données de résistance obtenues à partir de l'essai HIVNET-012 montrent clairement une émergence plus importante d'une résistance à la névirapine dans le sous-type D par rapport au sous-type A. Certaines équipes ont montré qu'il existait des profils de résistance différents entre les sous-types chez les patients traités par nelfinavir, comme par exemple la D30N qui est plus fréquemment sélectionnée dans les sous-types B par rapport au non B (Grossman, Paxinos et al. 2004) (Cane, de Ruitter et al. 2001). Pour finir, il ne semble pas que les souches non B développent des résistances par mutations à des positions qui ne sont pas associées à des résistances dans le sous-type B (Holguin, Paxinos et al. 2004).

Dans les années à venir, il est probable que de plus en plus de patients infectés par un sous-type non B bénéficient d'un traitement, ce qui permettra d'enrichir les bases de données à ce sujet ; ainsi, nous pourrions plus facilement évaluer l'impact de la variabilité génétique du VIH-1 sur les réponses thérapeutiques et d'apprécier pour ce type de souches les conséquences à plus long terme par exemple, sur l'évolution de la maladie. Dans cette optique, il est important de disposer de méthodes simples et fiables pour la détermination exacte des sous-types. En pratique quotidienne, il paraît important de prescrire systématiquement un génotype pour toute personne nouvellement infectée : tout d'abord, pour l'intérêt majeur qu'il présente dans le dépistage de la transmission de souches virales mutées, ensuite, parce qu'il permet le typage du virus par analyse phylogénétique;

enfin, il permettra de comparer lors d'un éventuel échec, les souches avant et après traitement.

La transmission de virus résistants aux antirétroviraux fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques. Cependant, l'hétérogénéité des méthodologies employées (méthodes génotypique ou phénotypique) rend difficile l'analyse et la comparaison des résultats. Par exemple, dans le cadre d'analyses génotypiques, les mutations conférant une résistance diffèrent selon les algorithmes utilisés. La mise en place au niveau mondial d'un réseau de surveillance de la transmission des mutations de résistance nécessite une standardisation des méthodes de laboratoire avec notamment la mise en place d'un algorithme unique et définitif pour l'étude des géotypes de résistance.



***Annexe 1 : Principales caractéristiques des 93 patients dont la souche virale appartient au sous-type non B :***

Patient	Sexe	Age	Mode de contamination	Pays d'origine	Pays/Région de contamination	Sérologie +	Début Traitement	Typage sur la protéase	Typage sur la TI	Typage sur la protéase et la TI	Sous-type Final
1	M	29	hétérosexuelle	Togo		28/01/2004	22/04/2004	CRF02			A et apparentés
2	M	36	hétérosexuelle	France		15/04/1995	12/03/1996	CRF01			A et apparentés
3	F	28	hétérosexuelle	Thaïlande				A1			A et apparentés
4	F	33	hétérosexuelle	Brésil		15/07/1997	15/07/1997		CRF01		A et apparentés
5	M	40	hétérosexuelle	Côte d'ivoire		15/01/1997	15/01/1997	CRF02			A et apparentés
6	F	43	hétérosexuelle	France		15/01/2001	19/03/2001		A1		A et apparentés
7	F	25	hétérosexuelle	Cameroun		05/11/1998	09/03/1999	CRF01/15			A et apparentés
8	F	24	hétérosexuelle	Cameroun		07/07/2003	06/01/2004	CRF02			A et apparentés
9	F	31	toxicomanie IV	France		02/10/1993	14/03/1994	CRF15			A et apparentés
10	F	33	hétérosexuelle	?		03/05/2001	19/07/2001	A1			A et apparentés
11	f	24	hétérosexuelle	France		15/12/1994	?	CRF02			A et apparentés
12	f	26	inconnu	Cameroun		05/04/1994	02/04/2003	CRF02			A et apparentés
13	M		hétérosexuelle	Zaïre				CRF03	A1	A1	A1
14	F	34	hétérosexuelle	Centrafrique		18/02/2000	03/03/2000	A1	A1		A1
15	M	50	transfusion	Afrique de l'ouest		15/03/1986	13/12/1991	CRF03	CRF01	A1	A1
16	F	9	materno-foetale	Afrique				A1	A1		A1
17	h	40	hétérosexuelle	Centrafrique				A1	A1		A1
18	h	15	inconnu	Rwanda		15/06/1994	15/09/1999	CRF03	A1/CRF01	A1	A1
19	f	34	hétérosexuelle	Rwanda		15/03/2002	31/03/2003	A1	A1		A1
20	F	44	hétérosexuelle	Côte d'ivoire		15/06/1992	01/08/1994	C	C	C	C
21	f	61	hétérosexuelle	France		26/09/1991	23/03/1993	C	C	C	C

22	F	33	hétérosexuelle	Somalie		15/08/1995	15/06/1996	C	C	C	C
23	F	52	hétérosexuelle	France	Afrique	04/12/2000	25/10/2004	CRF01	CRF01		CRF01
24	M	54	hétérosexuelle	France	Thaïlande	24/02/2004	hypo	CRF15	CRF01	CRF01	CRF01
25	M	34	hétérosexuelle	Guinée		30/07/2001	22/12/2001	A1	CRF01	CRF01	CRF01
26	F	39	autre	Zaïre		15/01/1995	16/10/1995	CRF03/15	CRF01	CRF01	CRF01
27	F	29	hétérosexuelle	Mali		14/06/2002	23/07/2003	CRF02	CRF01	CRF01	CRF01
28	F	40	hétérosexuelle	Centrafrique		12/06/2001	0	CRF01	CRF01		CRF01
29	F	39	hétérosexuelle	France		04/09/2004	0	CRF02	CRF02		CRF02
30	M	43	homosexuelle	France		30/07/1996	15/08/1996	CRF02	CRF02		CRF02
31	M	30	hétérosexuelle	Cameroun		26/02/2002	04/05/2004	CRF02	CRF02		CRF02
32	F	35	hétérosexuelle	France		01/07/1992	15/01/1993	CRF02	CRF02		CRF02
33	H	60	hétérosexuelle	France	Côte d'ivoire	15/07/2001	23/11/2001	CRF02	CRF02		CRF02
34	F	47	hétérosexuelle	France		20/02/1996	28/11/2002	CRF02	CRF02		CRF02
35	F	28	inconnu	Guinée		01/07/2002	01/08/2002	CRF02	CRF02		CRF02
36	M	52	hétérosexuelle	France	Gabon	23/12/1999	12/11/2001	CRF02	CRF02		CRF02
37	F	59	hétérosexuelle	Caire		13/07/1992	15/06/1996	CRF02	CRF02		CRF02
38	F	10	materno-fœtale	France			0	CRF02	CRF02		CRF02
39	F	45	hétérosexuelle	France		15/06/1988	16/01/1996	CRF02	CRF02		CRF02
40	M	33	hétérosexuelle	France	Burkina faso	17/06/1998	08/04/2002	CRF02	CRF02		CRF02
41	F	52	hétérosexuelle	Cameroun		02/05/1998	01/07/1998	CRF02	CRF02		CRF02
42	M	35	inconnu	Cameroun		22/02/1999	15/12/1999	CRF02	CRF02		CRF02
43	F	45	hétérosexuelle	Burkina faso		15/08/1989	15/11/1995	CRF02	CRF02		CRF02
44	F	33	hétérosexuelle	Mali				CRF02	CRF02		CRF02
45	M	42	inconnu	France	Afrique	15/06/1989	08/12/1999	CRF02	CRF02		CRF02
46	f	45	inconnu	France		15/03/2004	19/04/2004	CRF02	CRF02		CRF02
47	h	38	hétérosexuelle	Guinée		04/06/2002	28/10/2002	CRF02	CRF02		CRF02
48	h	39	hétérosexuelle	Côte d'ivoire		15/06/1994	15/05/2002	CRF02	CRF02		CRF02
49	F	35	hétérosexuelle	Niger		22/07/1999	02/08/2000	CRF06	CRF06		CRF06
50	F	0	materno-fœtale	France		01/04/2003	0	CRF02	CRF06	CRF06	CRF06
51	M	45	hétérosexuelle	France	Niger	20/10/2004	0	CRF06	CRF06		CRF06
52	M	55	autre	France	Cameroun	08/11/1992	0	CRF06	CRF06		CRF06
53	F	24	inconnu	Afrique		01/08/1992	0	CRF06	CRF06		CRF06
54	M	46	hétérosexuelle	Afrique		12/08/1998	10/08/2000	CRF11	CRF11		CRF11
55	F	30	transfusion	Congo		31/01/1998	23/12/1998	CRF13	CRF11	CRF13	CRF13
56	F	59	hétérosexuelle	Congo		15/07/1996	08/08/1996	CRF13	CRF13		CRF13
57	M	39	inconnu	France		07/05/1991	0	CRF14	CRF14		CRF14
58	M	40	autre	France		15/06/1990	15/05/1994	CRF06	D	CRF14	CRF14
59	M	43	hétérosexuelle	France				CRF14	CRF14		CRF14

60	F	52	hétérosexuelle	France		07/06/2001	30/08/2001	CRF14	CRF14		CRF14
61	F	31	toxicomanie IV	cap vert		17/03/1999	19/10/2000	CRF14	CRF14		CRF14
62	M	35	hétérosexuelle	Zaïre		06/01/1997	22/09/1997	A1/CRF03	CRF01	CRF15	CRF15
63	M	31	hétérosexuelle	Kenya		26/02/2003	24/03/2004	CRF15	CRF16	CRF16	CRF16
64	M	52	hétérosexuelle	France	Afrique noire	05/07/1996	15/09/1996	D	D		D
65	M	54	homosexuelle	Congo				D	D	D	D
66	M	31	homosexuelle	France		19/04/1997	0	D/CRF05	B	D	D
67	h	49	homosexuelle	France		29/11/1988	0	D	D		D
68	h	64	hétérosexuelle	France		15/06/1987	15/06/1996	D	D		D
69	f	37	autre	Kenya		09/09/1991	21/06/1994	D	A	D	D
70	F	35	hétérosexuelle	France	Afrique	15/07/1990	12/11/1997	CRF12	F1	F1	F1
71	M	15	inconnu	Roumanie				F1	F1		F1
72	F	51	autre	Gabon		15/06/1999	12/05/2003	F1	F1		F1
73	f	15	inconnu	Roumanie				F1	F1		F1
74	h	50	bisexuelle	France		15/07/2001	17/09/2001	CRF12	F1	F1	F1
75	F	28	hétérosexuelle	Cameroun		28/04/1998	04/12/1998	CRF02	F2	F2	F2
76	M	16	inconnu	?		17/02/2003	0	F2	F2		F2
77	F	25	hétérosexuelle	SierraLeone		25/06/2002	19/12/2002	G	G		G
78	M	34	hétérosexuelle	Togo		14/11/2000	02/05/2001	G	G		G
79	F	47	hétérosexuelle	?		15/03/1988	29/01/1989	G	G		G
80	F	29	hétérosexuelle	Thaïlande	Thaïlande	15/09/1993	07/04/1995	CRF11	H	H	H
81	M	63	hétérosexuelle	France		20/05/1999	16/11/1999	CRF07	B	B	I
82	M	42	homosexuelle	France		22/03/1997	14/04/1997	CRF07	B	B	I
83	M	49	hétérosexuelle	Angola		15/06/1990	0	U/CRF02	F1	non réalisé	I
84	M	44	hétérosexuelle	Burkina faso		01/06/1995	15/03/1996	CRF06			I
85	h	44	homosexuelle	France		15/10/1994	26/08/1998	CRF07	B	B	I
86	h	26	homosexuelle	Côte d'ivoire		08/01/2003	27/02/2003	CRF09			I
87	M	40	hétérosexuelle	Moyen orient		28/11/1992	15/02/1993	CRF11			J et apparentés
88	F	38	hétérosexuelle	Moyen orient		15/10/1992	15/02/1994	CRF11			J et apparentés
89	F	37	hétérosexuelle	Gabon		27/02/2000	15/04/2000	J			J et apparentés
90	F	32	hétérosexuelle	Cameroun		15/06/1998	15/11/1998	CRF11			J et apparentés
91	F	20	materno-fœtale	?		15/01/1986	15/06/1989	J	CRF11		J et apparentés
92	h	38	hétérosexuelle	France	Taiwan	15/05/1995	0	K/CRF01	CRF09	K	K
93	F	25	hétérosexuelle	Guinée		13/08/2002	20/03/2003	U	U		U



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Akinsete, O., D. Hirigoyen, et al. (2004). "K103N mutation in antiretroviral therapy-naive African patients infected with HIV type 1." Clin Infect Dis **39**(4): 575-8.
- Alaeus, A., K. Lidman, et al. (1999). "Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D." Aids **13**(8): 901-7.
- Anderson, J. P., A. G. Rodrigo, et al. (2000). "Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E." J Virol **74**(22): 10752-65.
- Andersson, S., H. Norrgren, et al. (1999). "Molecular characterization of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and -2 in individuals from guinea-bissau with single or dual infections: predominance of a distinct HIV-1 subtype A/G recombinant in West Africa." Virology **262**(2): 312-20.
- Apetrei, C., D. Descamps, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility." J Virol **72**(5): 3534-8.
- Apetrei, C., I. Loussert-Ajaka, et al. (1996). "Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions." Aids **10**(14): F57-60.
- Arion, D., N. Kaushik, et al. (1998). "Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase." Biochemistry **37**(45): 15908-17.
- Arion, D., N. Sluis-Cremer, et al. (2000). "Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase." J Biol Chem **275**(13): 9251-5.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Beer, B. E., E. Bailes, et al. (2000). "Patterns of genomic sequence diversity among their simian immunodeficiency viruses suggest that L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) are a natural lentivirus reservoir." J Virol **74**(8): 3892-8.
- BEH (2004). "Répartition des nouveaux diagnostics VIH en 2003 selon le groupe et le sous type." Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire n°**24-25**.

- Bhaskaran, K., D. Pillay, et al. (2004). "Do patients who are infected with drug-resistant HIV have a different CD4 cell decline after seroconversion? An exploratory analysis in the UK Register of HIV Seroconverters." Aids **18**(10): 1471-3.
- Bocket, L., A. Cheret, et al. (2005). "Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness." Antivir Ther **10**(2): 247-54.
- Boden, D., A. Hurley, et al. (1999). "HIV-1 drug resistance in newly infected individuals." Jama **282**(12): 1135-41.
- Bogard M, L. J. (1998). "Biologie moléculaire en biologie clinique. I. Méthodes."
- Brenner, B., D. Turner, et al. (2003). "A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Aids **17**(1): F1-5.
- Brodine, S. K., R. A. Shaffer, et al. (1999). "Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion." Ann Intern Med **131**(7): 502-6.
- Brun-Vezinet (1999). Un point sur la résistance aux antirétroviraux.
- Brun-Vezinet, F., C. Rouzioux, et al. (1985). "The possible role of a new lymphotropic retrovirus (LAV) in the pathogeny of AIDS and AIDS-related diseases." Prog Med Virol **32**: 189-94.
- Calvez, V., A. G. Marcelin, et al. (2004). Résistance du VIH aux inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse. D. T. B. éditions.: 8.
- Campbell, T., R. Young, et al. (2003). Antiviral activity of lamivudine in persons infected with HIV-1 that has M184V and multiple thymidine analogue mutations. 12th International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical implications, Los Cabos, Mexico.
- Cane, P. A., C. Aitkin, et al. (2004). "Pilot scheme for performance assessment of HIV-1 genotypic resistance testing in the UK." Commun Dis Public Health **7**(1): 24-9.
- Cane, P. A., A. de Ruyter, et al. (2001). "Resistance-associated mutations in the human immunodeficiency virus type 1 subtype c protease gene from treated and untreated patients in the United Kingdom." J Clin Microbiol **39**(7): 2652-4.

- Carr, J. K., M. O. Salminen, et al. (1998). "Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants." Virology **247**(1): 22-31.
- Carr, J. K., M. O. Salminen, et al. (1996). "Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand." J Virol **70**(9): 5935-43.
- Carr, J. K., J. N. Torimiro, et al. (2001). "The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon." Virology **286**(1): 168-81.
- Chaix, M. and J. Ghosn (2005). Virus résistant en primo-infection et réponse thérapeutique. XIVE HIV Drug Resistance, Quebec.
- Clavel, F., E. Race, et al. (2000). "HIV drug resistance and viral fitness." Adv Pharmacol **49**: 41-66.
- Coste, J., B. Montes, et al. (1996). "Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma." J Med Virol **50**(4): 293-302.
- Courouge, A. M. (1999). "[Sensitivity of screening kits for anti-HIV antibodies. 1999 update. Retrovirus Working Group of the French Society for Blood Transfusion]." Transfus Clin Biol **6**(6): 381-94.
- Couturier, E., F. Damond, et al. (2000). "HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network." Aids **14**(3): 289-96.
- Croteau, G., L. Doyon, et al. (1997). "Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors." J Virol **71**(2): 1089-96.
- Daniel, M. D., N. L. Letvin, et al. (1985). "Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques." Science **228**(4704): 1201-4.
- D'Aquila, R. T. (2000). "Limits of resistance testing." Antivir Ther **5**(1): 71-6.
- De Mendoza, C., J. del Romero, et al. (2002). "Decline in the rate of genotypic resistance to antiretroviral drugs in recent HIV seroconverters in Madrid." Aids **16**(13): 1830-2.
- De Pasquale, M. P., A. J. Leigh Brown, et al. (2003). "Differences in HIV-1 pol sequences from female genital tract and blood during antiretroviral therapy." J Acquir Immune Defic Syndr **34**(1): 37-44.

- Delaugerre, C., L. Morand-Joubert, et al. (2004). "Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission." Antivir Ther **9**(3): 415-21.
- Delfraissy. Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH. Recommandation du groupe d'expert. Paris: Flammarion Médecine-Science 2004: (7): 95-102.
- Delwart, E. L., E. G. Shpaer, et al. (1993). "Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes." Science **262**(5137): 1257-61.
- Descamps, D., C. Apetrei, et al. (1998). "Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors." Aids **12**(9): 1109-11.
- Descamps, D., M. L. Chaix, et al. (2005). "French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001-2002." J Acquir Immune Defic Syndr **38**(5): 545-52.
- Descamps, D., G. Collin, et al. (1997). "Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses." J Virol **71**(11): 8893-8.
- Deshpande, A., P. Recordon-Pinson, et al. (2004). "Molecular characterization of HIV type 1 isolates from untreated patients of Mumbai (Bombay), India, and detection of rare resistance mutations." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(9): 1032-5.
- Erice, A., D. L. Mayers, et al. (1993). "Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1." N Engl J Med **328**(16): 1163-5.
- Eron, J. J., S. L. Benoit, et al. (1995). "Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party." N Engl J med **333**(1662): 9.
- Espinosa, A., M. Vignoles, et al. (2004). "Intersubtype BF recombinants of HIV-1 in a population of injecting drug users in Argentina." J Acquir Immune Defic Syndr **36**(1): 630-6.
- Fang, G., B. Weiser, et al. (2004). "Recombination following superinfection by HIV-1." Aids **18**(2): 153-9.

- Fonjungo, P. N., E. N. Mpoudi, et al. (2000). "Presence of diverse human immunodeficiency virus type 1 viral variants in Cameroon." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(13): 1319-24.
- Frater, A. J., A. Beardall, et al. (2001). "Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients." *Aids* **15**(12): 1493-502.
- Frater, J., D. Dunn, et al. (2002). "Association between secondary mutations in human immunodeficiency virus type 1 protease and therapeutic outcome." *J Infect Dis* **185**(9): 1376; author reply 1376-7.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes." *Nature* **397**(6718): 436-41.
- Gao, F., L. Yue, et al. (1992). "Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa." *Nature* **358**(6386): 495-9.
- Garcia-Lerma, J. G., H. MacInnes, et al. (2004). "Transmitted human immunodeficiency virus type 1 carrying the D67N or K219Q/E mutation evolves rapidly to zidovudine resistance in vitro and shows a high replicative fitness in the presence of zidovudine." *J Virol* **78**(14): 7545-52.
- Gilbert, P. B., G. J. Hanna, et al. (2000). "Comparative analysis of HIV type 1 genotypic resistance across antiretroviral trial treatment regimens." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(14): 1325-36.
- Girardi, E. (2003). "Epidemiological aspects of transmitted HIV drug resistance." *Scand J Infect Dis Suppl* **35 Suppl 106**: 17-20.
- Granjean, M., T. Bourlet, et al. (2005). "[Human immunodeficiency virus type 1 subtypes in cohort of infected patients, Saint-Etienne, France, from 1984 to 2003]." *Med Mal Infect* **35**(2): 82-7.
- Grant, R. M., F. M. Hecht, et al. (2002). "Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons." *Jama* **288**(2): 181-8.
- Grossman, Z., E. E. Paxinos, et al. (2004). "Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2159-65.
- Gurtler, L. G., P. H. Hauser, et al. (1994). "A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon." *J Virol* **68**(3): 1581-5.

- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-14.
- Harzic, M., I. Pellegrin, et al. (2002). "Genotypic drug resistance during HIV-1 primary infection in France (1996-1999): frequency and response to treatment." Aids **16**(5): 793-6.
- Havlir, D. V., S. Eastman, et al. (1996). "Nevirapine-resistant human immunodeficiency virus: kinetics of replication and estimated prevalence in untreated patients." J Virol **70**(11): 7894-9.
- Heyndrickx, L., W. Janssens, et al. (2000). "Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities." J Virol **74**(1): 363-70.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, et al. (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." Nature **339**(6223): 389-92.
- Ho, D. D. (1995). "HIV-1 dynamics in vivo." J Biol Regul Homeost Agents **9**(3): 76-7.
- Hoelscher, M., S. Hanker, et al. (1998). "HIV type 1 V3 serotyping of Tanzanian samples: probable reasons for mismatching with genetic subtyping." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(2): 139-49.
- Holguin, A., E. Paxinos, et al. (2004). "Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes." J Clin Virol **31**(3): 215-20.
- Jackson, J. B., E. M. Piwowar, et al. (1997). "Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA sequences in HIV-1 antibody-positive blood donors in Uganda by the Roche AMPLICOR assay." J Clin Microbiol **35**(4): 873-6.
- Jaffar S, V. d. L. M., Eugen-Olsen J, Vincent T, Sarje-Njie R, Ngom P, Meyer AM, Berry N, Aaby P, Whittle H. (2005). "Immunological predictors of survival in HIV type 2-infected rural villagers in Guinea-Bissau." AIDS Res Retroviruses. **21**(6): 560-4.
- Jaffe, H. W. and G. Schochetman (1998). "Group O human immunodeficiency virus-1 infections." Infect Dis Clin North Am **12**(1): 39-46.
- Janssens, W., A. Buve, et al. (1997). "The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa." Aids **11**(6): 705-12.

- Jetzt, A. E., H. Yu, et al. (2000). "High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome." J Virol **74**(3): 1234-40.
- Johnson, V. A., C. J. Petropoulos, et al. (2001). "Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and continued evolution of drug resistance in an HIV-1-infected infant." J Infect Dis **183**(11): 1688-93.
- Jost, S., M. C. Bernard, et al. (2002). "A patient with HIV-1 superinfection." N Engl J Med **347**(10): 731-6.
- Kaleebu, P., N. French, et al. (2002). "Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda." J Infect Dis **185**(9): 1244-50.
- Kanki, P. J., D. J. Hamel, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression." J Infect Dis **179**(1): 68-73.
- Kantor, R., D. A. Katzenstein, et al. (2005). "Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration." PLoS Med **2**(4): e112.
- Kellam, P. and B. A. Larder (1994). "Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates." Antimicrob Agents Chemother **38**(1): 23-30.
- Kempf, D. J., J. D. Isaacson, et al. (2002). "Analysis of the virological response with respect to baseline viral phenotype and genotype in protease inhibitor-experienced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir therapy." Antivir Ther **7**(3): 165-74.
- Korber, B., M. Muldoon, et al. (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." Science **288**(5472): 1789-96.
- Lasky, M., J. L. Perret, et al. (1997). "Presence of multiple non-B subtypes and divergent subtype B strains of HIV-1 in individuals infected after overseas deployment." Aids **11**(1): 43-51.
- Leigh Brown, A. J., S. D. Frost, et al. (2004). "Genetic basis of hypersusceptibility to protease inhibitors and low replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1 strains in primary infection." J Virol **78**(5): 2242-6.
- Liitsola, K., I. Tashkinova, et al. (1998). "HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad." Aids **12**(14): 1907-19.

- Little, S. J., E. S. Daar, et al. (1999). "Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection." Jama **282**(12): 1142-9.
- Little, S. J., S. Holte, et al. (2002). "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV." N Engl J Med **347**(6): 385-94.
- Loemba, H., B. Brenner, et al. (2002). "Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT." Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2087-94.
- Lorenzi, P., M. Opravil, et al. (1999). "Impact of drug resistance mutations on virologic response to salvage therapy. Swiss HIV Cohort Study." Aids **13**(2): F17-21.
- LosAlamosNationalLaboratory (2005). "The circulating recombinant forms. <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs>."
- Loussert-Ajaka, I., T. D. Ly, et al. (1994). "HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients." Lancet **343**(8910): 1393-4.
- Lukashov VV, G. J. (2002). "Recent evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1 subtype B: reconstruction of epidemic onset based on sequence distances to the common ancestor." J Mol Evol. **54**(5): 680-91.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-94.
- Martinez-Picado, J., A. V. Savara, et al. (1999). "Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **73**(5): 3744-52.
- Masquelier, B., D. Descamps, et al. (1999). "Zidovudine resensitization and dual HIV-1 resistance to zidovudine and lamivudine in the delta lamivudine roll-over study." Antivir Ther **4**(2): 69-77.
- Masur, H., M. A. Michelis, et al. (1981). "An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction." N Engl J Med **305**(24): 1431-8.
- Mauclere, P., F. Damond, et al. (1997). "Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection." AIDS Res Hum Retroviruses **13**(12): 987-93.

- Mboudjeka, I., B. Bikandou, et al. (1999). "Genetic diversity of HIV-1 group M from Cameroon and Republic of Congo." Arch Virol **144**(12): 2291-311.
- McCutchan, F. E., P. A. Hegerich, et al. (1992). "Genetic variants of HIV-1 in Thailand." AIDS Res Hum Retroviruses **8**(11): 1887-95.
- Meyer, P. R., S. E. Matsuura, et al. (1999). "A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase." Mol Cell **4**(1): 35-43.
- Meyer, P. R., S. E. Matsuura, et al. (1998). "Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13471-6.
- Montavon, C., C. Toure-Kane, et al. (2000). "Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG." J Acquir Immune Defic Syndr **23**(5): 363-74.
- Najera, R., E. Delgado, et al. (2002). "Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic." Aids **16 Suppl 4**: S3-16.
- Nielsen, D. A., A. Novoradovsky, et al. (1995). "SSCP primer design based on single-strand DNA structure predicted by a DNA folding program." Nucleic Acids Res **23**(12): 2287-91.
- Nkengasong, J. N., B. Willems, et al. (1998). "Lack of correlation between V3-loop peptide enzyme immunoassay serologic subtyping and genetic sequencing." Aids **12**(12): 1405-12.
- Osmanov, S., C. Pattou, et al. (2002). "Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(2): 184-90.
- Ou, C. Y., Y. Takebe, et al. (1992). "Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand." AIDS Res Hum Retroviruses **8**(8): 1471-2.
- Parekh, B., S. Phillips, et al. (1999). "Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(2): 133-42.
- Pazhanisamy, S., C. M. Stuver, et al. (1996). "Kinetic characterization of human immunodeficiency virus type-1 protease-resistant variants." J Biol Chem **271**(30): 17979-85.

- Peeters, M. (2001). "The genetic variability of HIV-1 and its implications." Transfus Clin Biol **8**(3): 222-5.
- Peeters, M., V. Courgnaud, et al. (2002). "Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat." Emerg Infect Dis **8**(5): 451-7.
- Peeters, M. and E. Delaporte (1999). "[Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]." Med Trop (Mars) **59**(4 Pt 2): 449-55.
- Peeters, M., E. Esu-Williams, et al. (2000). "Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(4): 315-25.
- Peeters, M. and P. M. Sharp (2000). "Genetic diversity of HIV-1: the moving target." Aids **14 Suppl 3**: S129-40.
- Peeters, M., C. Toure-Kane, et al. (2003). "Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials." Aids **17**(18): 2547-60.
- Perez, E. E., S. L. Rose, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 protease genotype predicts immune and viral responses to combination therapy with protease inhibitors (PIs) in PI-naive patients." J Infect Dis **183**(4): 579-88.
- Perrin, L., L. Kaiser, et al. (2003). "Travel and the spread of HIV-1 genetic variants." Lancet Infect Dis **3**(1): 22-7.
- Piot, P., M. Bartos, et al. (2001). "The global impact of HIV/AIDS." Nature **410**(6831): 968-73.
- Preston, B. D., B. J. Poiesz, et al. (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." Science **242**(4882): 1168-71.
- Race, E. (2001). "Cross-resistance within the protease inhibitor class." Antivir Ther **6 Suppl 2**: 29-36.
- Rhodes, T., H. Wargo, et al. (2003). "High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication." J Virol **77**(20): 11193-200.
- Richman, D., C. K. Shih, et al. (1991). "Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors of reverse transcriptase arise in tissue culture." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11241-5.

- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." Science **288**(5463): 55-6.
- Sabino, E. C., E. G. Shpaer, et al. (1994). "Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil." J Virol **68**(10): 6340-6.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Salomon, H., M. A. Wainberg, et al. (2000). "Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study." Aids **14**(2): F17-23.
- Sarafianos, S. G., K. Das, et al. (1999). "Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10027-32.
- Schroeder, T. L., H. Burger, et al. (2005). "Characterization of intersubtype recombinant HIV type 1 genomes using a nonradioactive heteroduplex tracking assay." AIDS Res Hum Retroviruses **21**(4): 314-8.
- Shafer, R. W., J. A. Eisen, et al. (1997). "Sequence and drug susceptibility of subtype C reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in Zimbabwe." J Virol **71**(7): 5441-8.
- Shankarappa R, M. J., Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI (1999). "Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol. **73**(12): 10489-509.
- Sharp, P. M., E. Bailes, et al. (2000). "Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale." Biochem Soc Trans **28**(2): 275-82.
- Sharp, P. M., E. Bailes, et al. (1999). "Origins and evolution of AIDS viruses." Biol Bull **196**(3): 338-42.
- Simon, F., P. Mauclore, et al. (1998). "Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O." Nat Med **4**(9): 1032-7.
- Simon, V., J. Vanderhoeven, et al. (2002). "Evolving patterns of HIV-1 resistance to antiretroviral agents in newly infected individuals." Aids **16**(11): 1511-9.

- Soto-Ramirez, L. E., B. Renjifo, et al. (1996). "HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV." Science **271**(5253): 1291-3.
- Takehisa, J., L. Zekeng, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon." J Virol **73**(8): 6810-20.
- Tantillo, C., J. Ding, et al. (1994). "Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance." J Mol Biol **243**(3): 369-87.
- Tanuri, A., A. C. Vicente, et al. (1999). "Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 253-8.
- Thomson, M. M., E. Delgado, et al. (2002). "Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences." J Gen Virol **83**(Pt 1): 107-19.
- Tovanabutra, S., V. Watanaveeradej, et al. (2003). "A new circulating recombinant form, CRF15\_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand." AIDS Res Hum Retroviruses **19**(7): 561-7.
- Turner, D., A. Roldan, et al. (2004). "Variability in the PR and RT genes of HIV-1 isolated from recently infected subjects." Antivir Chem Chemother **15**(5): 255-9.
- Van de Vijver (2003). CATCH Study, <http://www.aidsmap.com>.
- Van Vaerenbergh, K., K. Van Laethem, et al. (2000). "Baseline HIV type 1 genotypic resistance to a newly added nucleoside analog is predictive of virologic failure of the new therapy." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(6): 529-37.
- Vergne, L., M. Peeters, et al. (2000). "Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients." J Clin Microbiol **38**(11): 3919-25.
- Vidal N, M.-K. C., Nzilambi N, Delaporte E, Peeters M (2000). "Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the democratic republic of congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(18): 2059-64.

- Wei, M., Q. Guan, et al. (2004). "Simple subtyping assay for human immunodeficiency virus type 1 subtypes B, C, CRF01-AE, CRF07-BC, and CRF08-BC." J Clin Microbiol **42**(9): 4261-7.
- Weisman Z, K. A., Borkow G, Stein M, Greenberg Z, Bentwich Z. (1999). "Infection by different HIV-1 subtypes (B and C) results in a similar immune activation profile despite distinct immune backgrounds." J Acquir Immune Defic Syndr **21**(2): 157-63.
- Wensing, A. M. and C. A. Boucher (2003). "Worldwide transmission of drug-resistant HIV." AIDS Rev **5**(3): 140-55.
- Wensing, A. M., D. A. van de Vijver, et al. (2005). "Prevalence of Drug-Resistant HIV-1 Variants in Untreated Individuals in Europe: Implications for Clinical Management." J Infect Dis **192**(6): 958-66.
- Yerly, S., L. Kaiser, et al. (1999). "Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants." Lancet **354**(9180): 729-33.

---

**Nom – Prénoms :** Gautier Nicolas, Cédric, Antoine  
**Titre de la thèse :** Distribution des sous-types du VIH 1 d'une cohorte de patients nantais : analyse du polymorphisme, impact sur la résistance.

---

**Résumé de la thèse :**

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 est caractérisé par une grande variabilité génétique liée à l'absence d'activité correctrice de sa transcriptase inverse ainsi qu'à sa capacité de recombinaison entre souches de différents sous-types. De ce fait, on observe une évolution continue de la distribution des sous-types du VIH 1 dans le monde et notamment dans les pays occidentaux.

Une étude épidémiologique rétrospective réalisée sur 603 patients nantais, montre que depuis quelques années, la prévalence des souches virales de type non B ne cesse d'augmenter : en 2004, elle atteint 46% des patients nouvellement infectés.

L'analyse génomique des souches virales de type non B de 53 patients naïfs, montre qu'il existe un polymorphisme naturel sur le gène de la protéase à des positions impliquées dans la résistance des souches de type B. Les mutations 20, 36, 41 et 69 sont fortement représentées dans le groupe non B à l'inverse des mutations 63 et 77 retrouvées plus fréquemment dans le groupe B. Selon l'algorithme d'interprétation des résistances de l'ANRS de juillet 2005, le pourcentage de patients présentant une résistance ou une résistance possible à au moins une molécule de la famille des IP, des INTI et des INNTI est respectivement de 3%, 7,1% et 5,4% pour les sous-types B et de 7,5%, 2,6% et 2,6% pour les sous-types non B. L'existence de souches de sensibilité diminuée aux antirétroviraux chez des patients nouvellement infectés motive la réalisation d'un génotype avant l'initiation d'un traitement.

---

**MOTS CLES :** VIH, sous-types non B, mutation, génotype, polymorphisme, algorithme.

---

**JURY :**

**Président :** Pr Berthe-Marie IMBERT (Université de Nantes)  
**Directeur de thèse :** Dr Virginie FERRE (Université de Nantes)  
**Membres du jury :** Pr François RAFFI (Université de Nantes)  
Dr Annick RUFFAULT (Université de Rennes)

---

**Adresse de l'auteur :** 4 rue Tivoli 44000 Nantes / email : nikogautier@yahoo.fr