

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 7 avril 2017
Par Mme DELDALLE Joséphine**

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990,

tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**GENOTYPAGE DE RESISTANCE DU VIH-1 CHEZ LES
PATIENTS NAIFS : APPORT DU SEQUENCAGE DE L'ADN PAR
METHODE SANGER ET DE L'ARN PAR SEQUENCAGE HAUT DEBIT**

Membres du jury :

Président : Madame le Docteur GOFFARD Anne, MCU-PH, Université Lille 2, CHRU Lille

Assesseurs : Madame le Professeur DECOSTER Anne, PU-PH, Faculté libre de médecine de Lille, GHICL Lomme

Madame le Docteur BOCKET Laurence, PH, CHRU Lille

Madame le Docteur AJANA Faïza, PH, CH Tourcoing

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur ALIDJINOU Enagnon Kazali, MCU-PH associé, Université Lille 2, CHRU Lille



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Vice-présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Murielle GARCIN
Professeur Annabelle DERAM
Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
Monsieur Ghislain CORNILLON
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Madame Nathalie ETHUIN
Madame Ilona LEMAITRE

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante M. Thomas MORGENROTH

Chef des services administratifs : Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
Mme	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique

Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie (80%)
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements :

A Madame le Docteur Anne GOFFARD

Maître de Conférences des Universités - Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lille 2,

Praticien Hospitalier – Laboratoire de Virologie, CHRU Lille

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Veuillez accepter mes remerciements pour le jugement de ce travail et pour m'avoir donné l'envie, depuis les bancs de la faculté, d'approfondir mes connaissances en virologie. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Anne DECOSTER

Professeur - Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille,

Praticien, Chef de service – Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Saint-Philibert, Lomme

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet. Soyez assurée de ma sincère considération.

A Madame le Docteur Laurence BOCKET

Praticien Hospitalier – Laboratoire de Virologie, CHRU Lille

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour vos conseils avisés durant ce travail. Soyez assurée de ma gratitude.

A Madame le Docteur Faïza AJANA

Praticien Hospitalier – Service Universitaire de Maladies Infectieuses et du Voyageur, CH
Tourcoing

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet. Soyez assurée de ma sincère considération.

A Monsieur le Docteur Enagnon Kazali ALIDJINOU

Maître de Conférences des Universités Associé - Faculté de Médecine, Université Lille 2,
Praticien Hospitalier – Laboratoire de Virologie, CHRU Lille

Merci pour ton encadrement, ta disponibilité et tes conseils avisés tout au long de l'élaboration de cette thèse. Puisse ce travail être le reflet de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma sympathie.

A Christophe HALLAERT

Un grand merci pour ta gentillesse, ta pédagogie et pour m'avoir fait découvrir le monde du NGS, tu as été d'une aide précieuse.

A l'ensemble des techniciens et des biologistes qui m'ont formée au cours de mes différents stages, et plus particulièrement, l'équipe de biologie moléculaire et de virologie, je vous remercie d'avoir partagé votre savoir et votre sympathie.

Au laboratoire MSD pour sa participation au financement des réactifs de séquençage et à la société ABL pour la mise à disposition de VisibleChek.

A ma famille, pour sa présence à mes côtés. Je vous remercie de toujours avoir cru en moi et de m'avoir encouragée durant toutes ces années.

A mon chéri, pour son soutien lors de la réalisation de ce travail. Merci d'avoir été mon Mentor Informatique, cela m'a permis d'éviter quelques prises de tête « pagination et autres réjouissances ». Je sais que tu l'as fait pour moi et pas seulement pour ton bien-être comme tu le dis souvent !

A Céline et Mathilde, pour les fous rires et votre amitié. Je serai toujours partante pour nos retrouvailles à la crêperie ou tout autre endroit.

A tous les pharmaciens, Perrine, Max, Justine, Marie, Vincent. Je vous ai rencontrés tardivement durant les études mais nous avons bien rattrapé le temps perdu !

A tous les super Amiénois que j'ai rencontrés lors de ma première année d'internat : Catarina, Elodie, Justine, Mj et Marion. Si beaucoup d'entre vous ont depuis quitté Amiens, c'est pour mieux se retrouver.

A tous mes cointernes lillois, et plus particulièrement Zoe, Gauthier, Vassana, Rena, Stéphanie et Simon, pour les moments de détente et pour m'avoir si bien intégrée à mon retour d'Amiens.

Et à tous ceux que je n'ai pas pu citer mais qui m'ont accompagnée durant ces années.

Table des matières

Remerciements :	7
Liste des abréviations.....	16
Introduction.....	19
I. Généralités sur l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine	21
1. Historique de la découverte du virus	21
2. Epidémiologie.....	21
2.1. Dans le monde	21
2.2. En Europe	22
2.3. En France.....	22
3. L'agent pathogène : le VIH	23
3.1. Structure	24
3.2. Organisation génomique	25
3.3. Cycle réplicatif.....	26
3.3.1. Attachement du virion	26
3.3.2. Fusion et décapsidation.....	27
3.3.3. Rétro-transcription et intégration.....	27
3.3.4. Transcription, export nucléaire et synthèse des protéines virales	27
3.3.5. Assemblage des particules virales, bourgeonnement, libération des particules virales et maturation extracellulaire	28
3.4. Diversité génétique du VIH-1.....	28
3.4.1. Groupe et sous-types	28
3.4.2. Notion de quasi-espèces	29
4. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1	29
4.1. La primo-infection.....	29
4.2. Stade chronique	30
4.3. Stade SIDA.....	30
5. Notion de réservoir	31
6. Notion de tropisme	32
II. Diagnostic et traitement de l'infection par le VIH	32
1. Diagnostic de l'infection par le VIH-1.....	33
1.1. Cinétique d'apparition des marqueurs anti-VIH1.....	33

1.2.	Stratégie diagnostique	34
2.	Traitement de l'infection par le VIH-1	35
2.1.	Indications et objectifs du traitement antirétroviral.....	35
2.2.	Rappel sur les différentes classes d'antirétroviraux (ARV).....	36
2.2.1.	Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	36
2.2.2.	Les inhibiteurs de la protéase (IP)	36
2.2.3.	Les inhibiteurs d'intégrase (II)	36
2.2.4.	Les inhibiteurs de fusion.....	37
2.2.5.	Les anti-CCR5	37
2.2.6.	Schémas thérapeutiques et recommandations	37
2.3.	Suivi virologique du traitement	37
2.3.1.	Mesure de la charge virale	37
2.3.2.	Etude de la résistance aux antirétroviraux.....	38
III.	Génotypage de résistance du VIH-1.....	39
1.	Indications	39
2.	Tests génotypiques de résistance	39
2.1.	Le séquençage Sanger.....	40
2.2.	Le séquençage de nouvelle génération (NGS).....	41
2.2.1.	La technologie 454 (Roche®)	41
2.2.2.	La technologie Ion Torrent®	43
2.2.3.	La technologie Illumina®	43
3.	Principales mutations associées à des résistances aux antirétroviraux	46
3.1.	Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de la transcriptase inverse	46
3.1.1.	Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) ..	46
3.1.2.	Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	46
3.2.	Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de la protéase	47
3.3.	Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de l'intégrase	47
3.4.	Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de fusion	47
3.5.	Mutations entraînant des résistances aux anti-CCR5.....	48
4.	Outils d'interprétation	48
I.	Objectifs du travail	50
II.	Matériels et méthodes.....	51

1.	Sélection des patients et échantillons	51
2.	Séquençage par méthode de Sanger	51
2.1.	Extraction des acides nucléiques	51
2.1.1.	Extraction de l'ARN.....	51
2.1.1.	Extraction de l'ADN	52
2.2.	Etape de rétro-transcription et PCR (RT-PCR) ou de PCR	53
2.2.1.	Rétro-transcription de l'ARN viral et PCR.....	53
2.2.2.	Réaction d'amplification par PCR (ADN)	54
2.2.3.	Etape de PCR nichée.....	54
2.3.	Purification.....	55
2.4.	Analyse des produits de PCR par électrophorèse.....	55
2.5.	Réaction de séquence et séquençage par méthode Sanger	56
3.	Séquençage à haut débit de l'ARN viral plasmatique	57
3.1.	Extraction de l'ARN	57
3.2.	Préparation de la Librairie	57
3.2.1.	Synthèse des ADNc.....	57
3.2.2.	Génération des amplicons par PCR	57
3.2.3.	Préparation du « Master Pool »	58
3.3.	PCR en émulsion – Clonage des fragments issus de la librairie.....	58
3.4.	Réaction de séquençage : le pyroséquençage.....	59
4.	Acquisition des données concernant la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase et interprétation.....	59
4.1.	Acquisition des données :	59
4.2.	Identification des mutations et choix des seuils de détection	60
4.3.	Interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux.....	60
5.	Analyse et interprétation du tropisme viral.....	61
6.	Analyse statistique	61
III.	Résultats.....	62
1.	Caractéristiques des patients.....	62
2.	Séquences et sous-types	62
3.	Analyse des mutations de résistance.....	63
3.1.	Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse (INTI)	65

3.2.	Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	66
3.3.	Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de la protéase.....	67
3.4.	Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase.....	69
3.5.	Corrélation des mutations détectées par séquençage Sanger sur ARN et sur ADN et du séquençage haut débit au seuil de 20%	70
4.	Interprétation de la résistance aux antirétroviraux selon différents algorithmes	72
4.1.	Résistance aux inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse (INTI) ..	74
4.2.	Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) 77	
4.3.	Résistance aux inhibiteurs de la protéase	78
4.4.	Résistance aux inhibiteurs de l'intégrase	80
5.	Tropisme viral.....	81
6.	Impact des variants minoritaires sur l'issue du traitement antirétroviral.....	82
IV.	Discussion.....	84
1.	Résistance aux antirétroviraux chez les patients naïfs	84
2.	Pertinence des données de la technique Sanger sur ADN.....	85
2.1.	Mutations de résistance sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de l'intégrase.....	85
2.2.	Le tropisme viral	86
3.	Apport du NGS dans la détection de mutations minoritaires sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de l'intégrase.....	87
4.	Impact des variants minoritaires sur l'issue du traitement antirétroviral.....	88
5.	Obstacles à la mise en œuvre du séquençage de haut débit en routine.....	90
6.	Différences de prédiction entre les algorithmes d'interprétation	91
	Conclusion et perspectives.....	92
	Annexes	93
	Bibliographie	95

Liste des Figures

Figure 1 : Estimation par région du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2015 (OMS 2016).....	21
Figure 2 : Découverte de séropositivité VIH par région de domicile, France, 2003- 2015	23
Figure 3: Structure du virus de l'immunodéficience humaine (30)	24
Figure 4 : Organisation génomique du VIH-1 sous forme d'ADN proviral intégré dans le génome cellulaire (32).....	25
Figure 5 : Le cycle répliatif du VIH-1 (32).....	26
Figure 6 : Evolutivité de la charge virale et des anticorps anti-VIH1 au cours du temps	30
Figure 7 : Cinétique d'apparition des marqueurs VIH-1	33
Figure 8 : Algorithme de dépistage de l'infection à VIH-1 chez l'adulte et l'enfant de plus de 18 mois (HAS 2009)	34
Figure 9 : Principe de la méthode séquençage Sanger (d'après Leong et al, 2014) (83).....	40
Figure 10 : Principe détaillé de la technologie 454 (d'après Mardis, 2008) (18).....	42
Figure 11 : Principe détaillé de la technologie Illumina®(d'après Mardis, 2013 et Metzker, 2010) (18,19)	44
Figure 12 : Comparatifs des différentes techniques de séquençage de 2 ^{ème} génération	45
Figure 13 : Obtention des séquences et interprétation.....	59
Figure 14 : Répartition des sous-types au sein de la population d'étude	63
Figure 15 : Mutations associées à la résistance aux INTI (IAS-USA 2015)	65
Figure 16 : Mutations associées à la résistance aux INNTI (IAS-USA 2015).....	66
Figure 17 : Mutations associées à la résistance aux IP (IAS-USA 2015).....	68
Figure 18 : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'intégrase (IAS-USA 2015) .	69
Figure 19 : Tropisme viral en fonction de la matrice utilisée.....	81

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification de l'infection VIH pour les adultes (d'après le CDC, 1993)	31
Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour le séquençage par méthode Sanger (ANRS 2015)	52
Tableau 3 : Mélange réactionnel utilisé pour la rétro-transcription par méthode Sanger	53
Tableau 4 : Conditions nécessaires pour la rétro-transcription par méthode Sanger.....	53
Tableau 5 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR.....	54
Tableau 6 : Conditions d'amplification pour la réaction de PCR.....	54
Tableau 7 : Mélange réactionnel utilisé pour la nested-PCR.....	55
Tableau 8 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de séquence.....	56
Tableau 9 : Conditions réactionnelles pour la réaction de séquence.....	56
Tableau 10 : Conditions nécessaires pour la rétrotranscription pour le séquençage NGS	58
Tableau 11 : Conditions de réalisation de la PCR en émulsion	58
Tableau 12 : Caractéristiques des patients	62
Tableau 13 : Nombre cumulatif de mutations associées à la résistance (IAS-USA 2015) chez l'ensemble des patients	64
Tableau 14 : Prévalence des mutations majeures associées à la résistance (IAS-USA 2015) dans la population d'étude	64
Tableau 15 : Concordance entre Sanger ARN, Sanger ADN et NGS 20%.....	71
Tableau 16 : Interprétation de la résistance aux antirétroviraux selon trois algorithmes	73
Tableau 17 : Patients intermédiaire ou résistant à au moins un médicament antirétroviral, selon trois algorithmes d'interprétation.....	74
Tableau 18 : Résistance aux inhibiteurs nucléosi(t)i diques de la transcriptase inverse.....	76
Tableau 19 : Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse	77
Tableau 20 : Résistance aux inhibiteurs de la protéase.....	79
Tableau 21 : Résistance aux inhibiteurs de l'intégrase	80
Tableau 22 : Profil initial de résistance des patients n'ayant pas négativé leur charge virale après six mois de traitement.....	83

Liste des abréviations

- ABC : Abacavir
- Ac : Anticorps
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
- ADVIH : Autotest de Dépistage de l'Infection à VIH
- Ag : Antigène
- ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales
- ARN : Acide RiboNucléique
- ARNm : Acide RiboNucléique messenger
- ARV : AntiRétroviraux
- ATP : Adénosine TriPhosphate
- ATV : Atazanavir
- BID : *Bis In Die* (du latin, deux fois par jour)
- CCR5 : C-C chemokine Receptor type 5
- CDC : Center for Disease Control and Prevention (agence américaine pour le contrôle et la prévention des maladies)
- CDD : *Charge-Coupled Device* (dispositif à transfert de charge)
- CMV : CytoMégaloVirus
- CRF : *Circulating Recombinant Forms* (formes recombinantes circulantes)
- CXCR4 : *CXC chemokine Receptor type 4*
- dNTP : désoxyriboNucléotides TriPhosphates
- ddNTP : didésoxyriboNucléotides TriPhosphates
- DDI : Didanosine
- DRV : Darunavir
- DTG : Dolutégravir
- d4T : Stavudine
- ECDC : *European Center for Disease Control and Prevention* (agence européenne pour le contrôle et la prévention des maladies)
- EFV : Efavirenz
- ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
- EMA : *European Medicines Agency* (agence européenne des médicaments)

- ETR : Etravirine
- EVG : Elvitégravir
- FPR : *False Positive Rate* (taux de faux positif)
- FPV : Fosamprénavir
- FTC : Emtricitabine
- gp : glycoprotéine
- HAART : *Highly Active Antiretroviral Therapy* (thérapie antirétrovirale hautement active)
- HAS : Haute Autorité de Santé
- HHV8 : Human Herpes Virus 8
- IAS : *International AIDS Society*
- IB : Immunoblot
- IDV : Indinavir
- II : Inhibiteurs d'Intégrase
- INNTI : Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
- INTI : Inhibiteurs Nucléosi(ti)diques de la Transcriptase Inverse
- INVS : Institut National de Veille Sanitaire
- IP : Inhibiteurs de Protéase
- LTR : *Long Terminal Repeat*
- LPV : Lopinavir
- MID : *Multiplex Identifier*
- NA : Non Applicable
- NaOH : Hydroxyde de sodium
- NGS : *Next Generation Sequencing* (séquençage de nouvelle génération)
- NFV : Nelfinavir
- NVP : Névirapine
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- Pb : Paire de bases
- PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction en chaîne par polymérase)
- PPi : PyroPhosphate inorganique
- PTP : *Pico Titer Plate*
- QD : *Quaque Die* (du latin, une fois par jour)
- RAL : Raltégravir
- RPV : Rilpivirine

- RT : *Reverse Transcriptase* = TI : Transcriptase Inverse
- RTV : Ritonavir
- SQV : Saquinavir
- SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
- SVM : *Support Vector Machine* (machine à vecteur de support)
- TAMs : *Thymidine Analog Mutations*
- TDF : Ténofovir
- TI : Transcriptase Inverse
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- WB : Western blot
- ZDV : Zidovudine
- 3TC : Lamivudine

Introduction

Depuis la découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la pandémie liée à ce virus s'est révélée être une des plus importantes de notre siècle ; et un véritable défi pour les médecins et les chercheurs. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), près de 37 millions de personnes vivaient avec ce virus en 2015 dans le monde, dont près de 65 % en Afrique subsaharienne. Le VIH a tué 1,1 millions de personnes en 2015 et près de 39 millions depuis la découverte du virus (1). Depuis plus de vingt ans, des recherches intenses ont permis la mise à disposition de molécules antirétrovirales efficaces. Une stratégie thérapeutique à base d'association de molécules (trithérapie « hautement active » ou en anglais HAART "Highly Active Antiretroviral Therapy") a conduit à une diminution très importante de l'évolution vers le stade SIDA, et une meilleure qualité de vie dans les pays développés, même si, malheureusement, l'accès reste limité dans les pays sous-développés.

L'émergence de la résistance aux antirétroviraux, compromettant l'efficacité de ces traitements, est apparue très vite comme un grand défi. Cette résistance, est liée à un taux élevé de mutations au cours de la réplication du virus, et à une sélection sous traitement de variants résistants à l'activité des molécules utilisées. La France, comme la plupart des pays développés, préconise la réalisation d'un test génotypique pour détecter la présence de mutations de résistance avant la mise sous traitement (2). En effet, la détection de mutations de résistance chez les patients VIH-1 nouvellement diagnostiqués est importante car la résistance primaire est associée à un taux d'échec non négligeable du traitement antirétroviral de première ligne (3,4). De plus, ces résultats sont utiles pour guider les cliniciens dans le choix du traitement ayant la meilleure probabilité d'obtention de réponse virologique, ainsi que pour connaître l'épidémiologie de la transmission de résistance.

Le génotypage de résistance est actuellement réalisé en pratique courante sur de l'ARN viral plasmatique. Il peut également être réalisé sur de l'ADN proviral contenu dans les cellules (réservoir de l'infection), mais cette approche n'est pas recommandée en routine lorsque la charge virale plasmatique est suffisante pour permettre un séquençage optimal de l'ARN viral. Le séquençage de l'ADN proviral pourrait, en effet, mieux refléter la diversité virale, et augmenter le taux de détection des mutations de résistance, mais l'interprétation peut être délicate. Les données de la littérature sont parfois contradictoires en fonction du profil des patients. Ainsi, le séquençage ADN a permis la détection de mutations supplémentaires chez des patients naïfs (5–7), alors que cette approche a été retrouvée moins performante chez

des patients traités (8–10). Par ailleurs, il peut exister avec le séquençage ADN des interférences dues à la présence potentielle de virus défectifs, incapables de se répliquer. Ces variants résultent souvent de l'activité des protéines APOBEC3, protéines de défense de l'organisme, qui entraînent un phénomène d'hypermutation (11–14).

Le séquençage de l'ARN est habituellement réalisé dans les laboratoires cliniques par la méthode Sanger, mais cette technique est limitée par l'absence de détection des mutations ayant une prévalence inférieure à 20% (15–17). Des techniques de séquençage plus sensibles, notamment les approches de séquençage à haut débit, ont été développées ces dernières années. Le séquençage à haut débit peut permettre, de façon aisée, la détection des variants minoritaires jusqu'à 1% (18,19).

Dans les laboratoires de virologie clinique, les profils de sensibilité aux antirétroviraux sont habituellement déterminés grâce à des algorithmes d'interprétation sur la base des mutations présentes. Cependant les prédictions peuvent varier significativement d'un algorithme à l'autre (20).

Il est primordial pour le laboratoire de disposer d'outils performants, ayant une corrélation suffisante avec les données cliniques, afin de guider au mieux le clinicien dans son choix du traitement ayant la meilleure probabilité de succès virologique. Le présent travail de comparaison de méthodes de séquençage pour le génotypage de résistance du VIH-1 chez les patients naïfs s'inscrit dans cette perspective.

Partie 1 : Généralités

I. Généralités sur l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. Historique de la découverte du virus

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a été évoqué pour la première fois en 1981, aux Etats-Unis, par le CDC (Center for Disease Control and Prevention), devant des cas de jeunes hommes, homosexuels actifs, atteints de pneumocystose dans un contexte d'immunodéficience sévère (21). C'est en 1983 à l'institut Pasteur de Paris, que le virus responsable de cette pathologie, le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), a été isolé par l'équipe des Pr Barré-Sinoussi et Pr Montagnier(22), et cette découverte leur a valu l'attribution du prix Nobel de médecine en 2008. Le VIH-2 a été découvert trois ans plus tard par l'équipe du Pr Clavel.(23)

2. Epidémiologie

2.1. Dans le monde

Selon l'OMS, on comptait fin 2015, 36,7 [34-39,8] millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde ; dont 25,6 [23-28,8] millions en Afrique subsaharienne (1) (Figure 1).

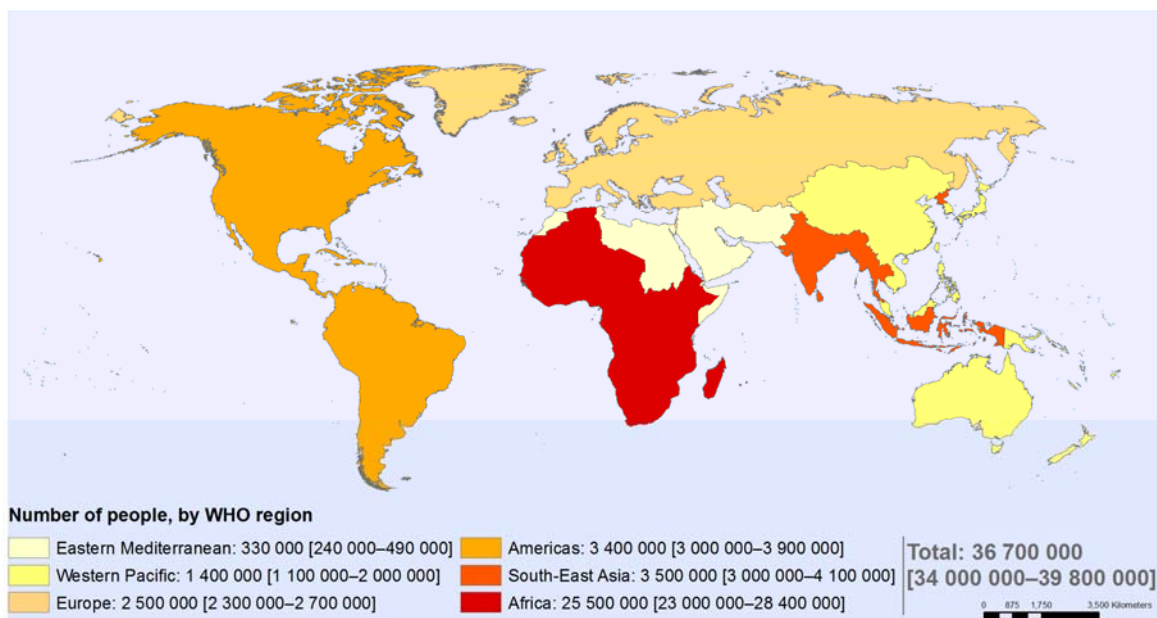


Figure 1 : Estimation par région du nombre de personnes vivant avec le VIH en 2015 (OMS 2016)

Le nombre de nouvelles infections à VIH diminue mais le nombre de personnes vivant avec le VIH continue d'augmenter ; principalement car davantage de personnes (18,2 [16,1-19,0] millions mi-2016) ont accès à la thérapie antirétrovirale, vivent plus longtemps, et en meilleure santé. Néanmoins, en 2015, 1,1 [940 000-1,3] millions de personnes sont décédées de maladies liées au SIDA (1).

2.2.En Europe

Selon les données de l'ECDC (European Center for Disease Control and Prevention) en 2014, la situation en Europe est stable depuis une dizaine d'années. Cependant, l'Europe de l'Est reste plus touchée que l'Europe de l'Ouest (24). L'évolution de la démographie de l'infection à VIH est globalement comparable dans la plupart des pays de l'Europe de l'Ouest (24,25).

2.3.En France

En France, la déclaration obligatoire des diagnostics d'infections à VIH permet de disposer d'une estimation de la prévalence de l'infection à VIH et des caractéristiques des personnes infectées par ce virus. Ainsi, selon les données de surveillance publiées par l'INVS, près de 6000 personnes ont découvert leur séropositivité VIH en 2015. Ce nombre est stable depuis 2011 et comprend, pour l'année 2015, 43% d'hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH), 38% d'hétérosexuels nés à l'étranger, 16% d'hétérosexuels nés en France et 2% d'usagers de drogues (26). Plus de 60% des contaminations sont liées aux personnes ignorant leur séropositivité (environ 29 000 (IC95% : [24 200 – 33 900]) personnes fin 2010) (27).

En 2013, parmi les personnes ayant découvert leur séropositivité, 10% étaient au stade de primo-infection symptomatique (proportion stable depuis 2010), 66% à un stade asymptomatique, 13% à un stade symptomatique non SIDA et 11% au stade SIDA. L'évolution depuis 2003 montre une diminution progressive des découvertes au stade SIDA (20% en 2003) contrebalancée par une augmentation des stades asymptomatiques (59% en 2003) probablement en lien avec une politique de dépistage plus large et des campagnes de sensibilisation du grand public (25).

En 2012, 149 900 (IC95% : [134 700 - 164 900]) personnes vivaient avec le VIH soit environ 4 personnes sur 1 000 (27). Les régions les plus touchées sont l'Île-de-France, la Martinique, la Guadeloupe et la Guyane (26) (Figure 2).

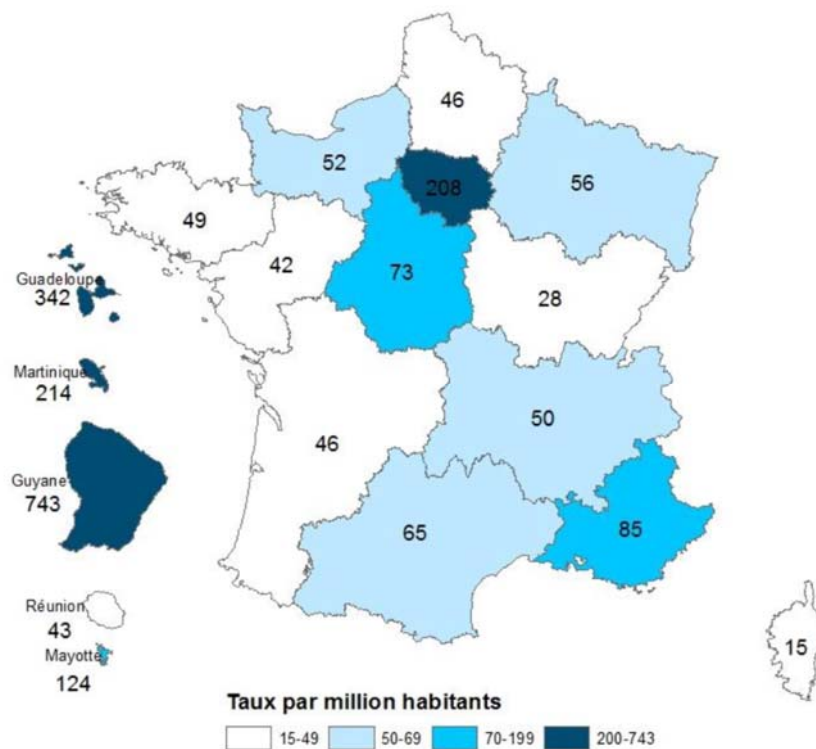


Figure 2 : Découverte de séropositivité VIH par région de domicile, France, 2003- 2015

Depuis le début de l'épidémie, on estime le nombre de personnes en France ayant développé un SIDA à 89 000, dont 48 000 sont décédées et 41 000 encore vivantes fin 2013 (25). En France, on estime que 90% des patients connaissant leur séropositivité pour le VIH sont sous traitement antirétroviral et que 90% des patients traités ont une charge virale indétectable (objectifs ONUSIDA (28)). Tous les ans, il y a environ 3000 décès chez les séropositifs (dont 1/ 3 liés au SIDA)(27).

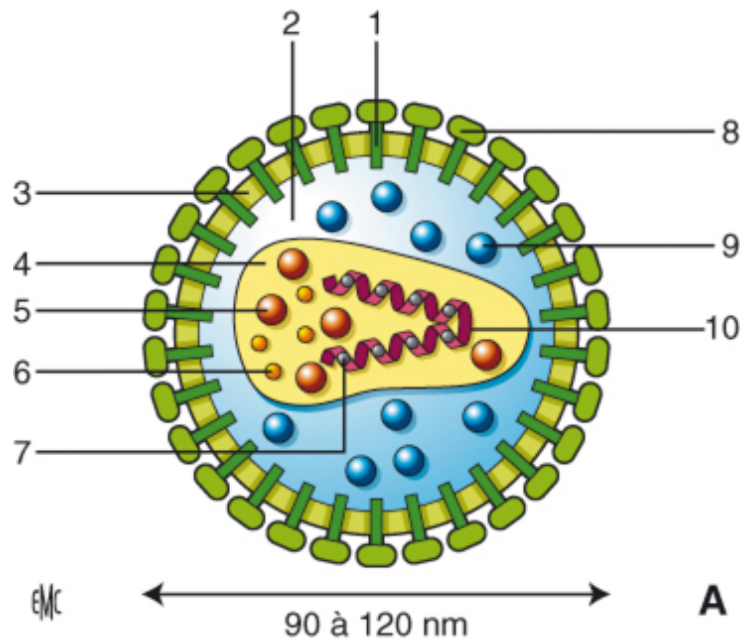
En 2013, la part des infections à VIH-2 était de 1,2%, principalement chez des patients nés en Côte-d'Ivoire ou au Sénégal. Parmi les infections à VIH-1, la proportion de sous-types non B était de 42% (proportion stable depuis 2008)(25).

3. L'agent pathogène : le VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus*. Les rétrovirus sont caractérisés par la présence d'une enzyme virale, la *reverse transcriptase* (RT) ou transcriptase inverse (TI), qui permet la rétrotranscription de leur génome de type ARN en ADN simple brin. Le VIH-1 et le VIH-2 présentent la même organisation génomique et la même structure mais ne présentent qu'une homologie génétique de 49% (29). De même, les poids moléculaires de leurs protéines et l'histoire naturelle de l'infection sont assez différents. Le VIH-1 étant responsable de la pandémie mondiale, nous parlerons essentiellement de celui-ci dans la suite de ce travail.

3.1. Structure

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 90 à 120 nm de diamètre composé de trois structures principales : l'enveloppe externe, la matrice, et la capside qui renferme le génome constitué d'un ARN simple brin diploïde (Figure 3).



1. GP41 ; 2. matrice ; 3. membrane ; 4. capside ; 5. transcriptase inverse ; 6. intégrase ; 7. nucléocapside ; 8. GP120 ; 9. protéase ; 10. acide ribonucléique (ARN)

Figure 3: Structure du virus de l'immunodéficience humaine (30)

L'enveloppe externe est constituée d'une bicouche lipidique formée à partir de la membrane cellulaire de la cellule hôte infectée, au moment du bourgeonnement du virus, et de deux glycoprotéines virales, la gp120 (externe) et la gp41 (transmembranaire). Ces deux glycoprotéines jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'attachement du virus à la cellule (31).

Sous l'enveloppe se trouve la nucléocapside contenant trois protéines : la protéine de matrice (p17), la protéine de la capside (p24) qui est sécrétée lors de la primo-infection, et la protéine de nucléocapside (p6-p7) (30).

A l'intérieur de la nucléocapside, se trouve le génome viral constitué de deux ARN monocaténaire de polarité positive, ainsi que des enzymes nécessaires à la réplication : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase (30).

3.2. Organisation génomique

Le génome ARN du VIH-1 a une longueur 9,6 kilobases. Il possède à ses extrémités deux régions non codantes composées de séquences répétées (en anglais *long terminal repeat* ou LTR) qui jouent un rôle essentiel dans l'intégration du virus et sa transcription. Entre les deux LTR, comme pour tous les *Retroviridae*, on retrouve trois gènes de structure (Figure 4) :

- le gène *gag* codant pour les protéines de matrice (p17), de capsid (p24) et de nucléocapside (p6-p7) ;
- le gène *pol* codant pour la protéase (p12), la rétro-transcriptase (p51 et p66) et l'intégrase (p32) ;
- le gène *env* codant pour les glycoprotéines d'enveloppe (gp120 et gp 41).

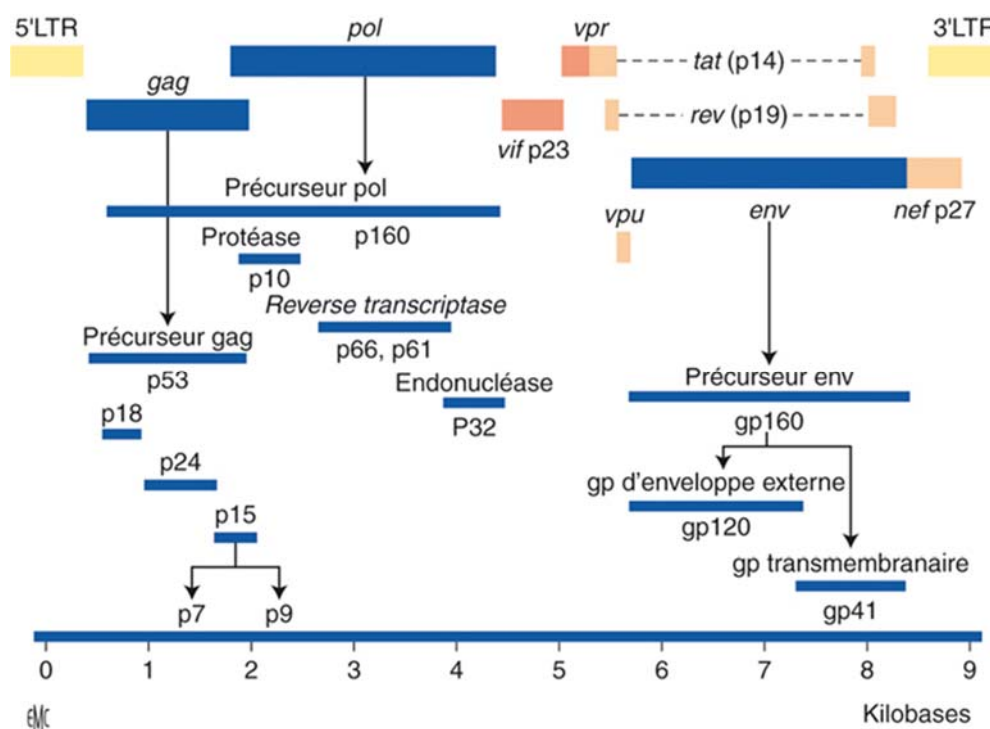


Figure 4 : Organisation génomique du VIH-1 sous forme d'ADN proviral intégré dans le génome cellulaire (32)

Le VIH-1 possède également de nombreux gènes régulateurs qui complexifient son organisation génétique. Les gènes *tat* (*transactivator of transcription*) et *rev* (*regulator of viral expression*) participent à la régulation de la transcription ; ils sont indispensables à la réplication virale. D'autres gènes tels que *vif* (*viral infectivity factor*), *nef* (*negative expression factor*), *vpr* (*viral protein r*) et *vpu* (*viral protein u*) codent pour des protéines accessoires puisque leur expression n'est pas essentielle à la réplication du VIH-1 *in vitro*. Cependant, ces protéines accessoires restent indispensables pour la réplication virale et la pathogénèse *in vivo* (32).

3.3.Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif du VIH-1 peut être divisé en deux étapes :

- la première débute par l'attachement du virus à la molécule CD4 et se termine par l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire ;
- la seconde débute par la transcription de l'ADN proviral et se termine par la libération de nouveaux virions par bourgeonnement à la surface de la cellule.

Ces différentes étapes sont détaillées ci-dessous.

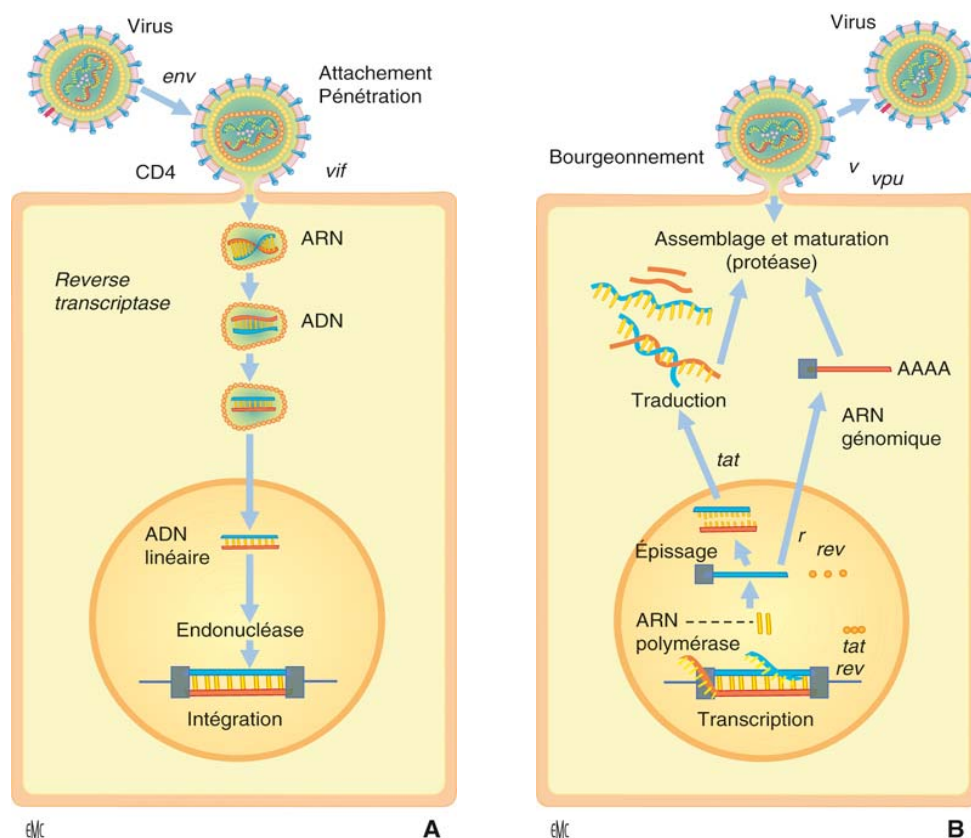


Figure 5 : Le cycle réplcatif du VIH-1 (32)

3.3.1. Attachement du virion

L'étape initiale du cycle de réplcation du VIH-1 est l'attachement du virion à la surface d'une cellule cible par l'interaction entre la gp120 virale et le récepteur CD4 cellulaire. Cette fixation est suivie d'un clivage protéolytique de la boucle V3 de la gp120 par des protéases cellulaires, à l'origine d'un changement conformationnel de la gp120 lui permettant de reconnaître un corécepteur situé à la surface de la cellule. CCR5 et CXCR4 sont les principaux corécepteurs du VIH-1 (33).

Les cellules cibles du VIH sont principalement les cellules exprimant le récepteur CD4. Il s'agit principalement des lymphocytes T, mais aussi les cellules présentatrices d'antigène telles que : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langherans ou encore les cellules microgliales (33–35).

3.3.2. Fusion et décapsidation

L'attachement du virion à la cellule hôte s'accompagne également de modifications de conformation permettant à la gp41 de libérer son peptide de fusion. Il y a alors fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire de la cellule hôte ; et donc pénétration du virus à l'intérieur de la cellule (33). Une fois à l'intérieur de la cellule, la capsid se désagrège partiellement et libère l'ARN et les enzymes.

3.3.3. Rétro-transcription et intégration

La rétro-transcription est réalisée par la reverse transcriptase (RT). La RT est une enzyme qui possède trois activités enzymatiques distinctes :

- une activité ADN polymérase ARN dépendante, permettant la transformation de l'ARN génomique viral en ADNc ;
- une fonction RNase, à l'origine de la destruction progressive du modèle ARN ;
- une activité ADN polymérase ADN dépendante, permettant la synthèse d'une molécule d'ADN bicaténaire.

Ainsi, dès l'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADNc, qui est ensuite copié en ADN bicaténaire.

L'ADN double brin passe alors dans le noyau et s'intègre dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée sous forme de provirus grâce à l'activité endonucléasique de l'intégrase virale (11,32).

3.3.4. Transcription, export nucléaire et synthèse des protéines virales

La transcription du génome viral en ARNm s'effectue par l'ARN polymérase II cellulaire, à partir de la région LTR 5' de l'ADN. Les transcrits épissés ou partiellement épissés codent pour les protéines virales. La protéine rev favorise le transport de ces ARNm du noyau vers le cytoplasme. Les transcrits non épissés constituent l'ARN génomique.

Les premiers ARN transcrits codent pour les gènes régulateurs, en particulier les gènes *tat*, *rev* et *nef*. Après cette phase précoce, apparaissent les ARNm plus longs codant pour les

protéines gag, pol, env, vif, vpr. Les ARNm codant pour les protéines de structure sont de deux types :

- ceux correspondant au gène *gag-pol*, qui seront traduits en une polyprotéine secondairement clivée en protéines internes et enzymes par la protéase virale ;
- et ceux correspondant au gène *env*, qui seront traduits par les ribosomes de la cellule hôte en gp160. Cette glycoprotéine sera ensuite clivée par une protéase cellulaire en gp41 et gp120 (11,32).

3.3.5. Assemblage des particules virales, bourgeonnement, libération des particules virales et maturation extracellulaire

La synthèse des protéines virales est suivie de l'encapsidation et de la dimérisation de l'ARN viral. L'assemblage des particules virales se fait dans le cytoplasme cellulaire par l'intervention des protéines de nucléocapside. Les nouveaux virions quittent la cellule par bourgeonnement sous une forme immature (action des protéines vpr et vif). La maturation extracellulaire est liée à l'action de la protéase virale (11).

3.4. Diversité génétique du VIH-1

La variabilité génétique est une caractéristique majeure des virus à ARN, et donc du VIH-1. Le taux de mutation a été estimé à 1 pour 10 000 ou 100 000 bases par cycle de réplication (36). Les différents mécanismes de cette extrême diversité sont :

- une réplication virale intense (37) ;
- un taux élevé de recombinaison (38) ;
- et un taux d'erreur élevé de la RT qui ne possède pas de système de correction en cas d'incorporation erronée d'un nucléotide (37).

3.4.1. Groupe et sous-types

Le VIH-1 est actuellement subdivisé en quatre groupes : le groupe Majoritaire (M) et trois autres minoritaires, principalement identifiés dans quelques pays d'Afrique Centrale. Il s'agit des groupes O (Outlier), N (pour non-M, non-O) et plus récemment identifié, le groupe P.

Le groupe M est actuellement subdivisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et 55 formes recombinantes (CRF : *Circulating recombinant forms*), mais ce nombre ne cesse d'augmenter. La différence des séquences nucléotidiques du gène *env* est de 20 à 30% entre

les sous-types et de 14% pour le gène *gag*. A l'intérieur d'un même sous-type, les divergences sont de l'ordre de 5 à 20% (30,32,39).

La répartition géographique des VIH-1 diffère selon l'ancienneté de l'épidémie dans le pays et selon les migrations de populations. Ainsi, le sous-type C est majoritaire dans le monde (48%), et en particulier dans le sud et l'est de l'Afrique, tandis que le sous-type B représente 11% des infections à VIH-1 dans le monde, mais est majoritaire dans les pays occidentaux. Les autres sous-types fréquents sont les sous-types A (12%), G (6,3%), CRF01-AG (8%) et CRF01-AE (5%) (40). En France, le sous-type B est majoritaire et représentait 59 % des diagnostics d'infections à VIH-1 entre 2003 et 2010 (41).

3.4.2. Notion de quasi-espèces

Chez le sujet récemment infecté, les virus circulants sont génétiquement homogènes. Cette population virale évolue et il est actuellement admis que le taux global de changement par an est de 1% pour le gène *env* et de 0,5% pour le gène *gag*. Cette coexistence de plusieurs variants au sein d'un même patient est appelée « quasi-espèce » (32).

La variabilité génétique du VIH-1 permet au virus d'échapper facilement au système immunitaire, de résister au traitement antirétroviral, et crée des difficultés à l'élaboration d'un vaccin.

4. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1

En l'absence de traitement, l'évolution naturelle de l'infection à VIH-1 peut être déclinée en trois phases : la primo-infection, la phase chronique et le stade SIDA.

4.1. La primo-infection

La primo-infection est la phase initiale d'invasion virale de l'organisme, elle s'accompagne d'une réplication virale très intense et d'une dissémination dans l'organisme (Figure 6). L'intensité de la réplication virale est corrélée dès ce stade à l'importance du réservoir viral (42–44).

La primo infection peut être asymptomatique ou se présenter sous la forme d'un syndrome viral aigu. Les patients qui présentent une primo-infection symptomatique, surtout quand elle dure plus de deux semaines, vont évoluer plus rapidement et de manière plus sévère vers le stade SIDA. Les signes cliniques apparaissent généralement dans les 10 à 15 jours après la contamination et peuvent persister jusqu'à 10 semaines (45). Le tableau est celui

d'un syndrome pseudogrippal avec fièvre, céphalées, myalgies, éruptions maculopapulaires ou encore des signes digestifs (diarrhées, douleurs abdominales...) (46).

4.2. Stade chronique

Pendant plusieurs années, les lymphocytes T CD4, progressivement détruits par le virus, se renouvellent rapidement et permettent de maintenir un équilibre entre la réplication virale et la réponse immunitaire (Figure 6), même si la diminution du taux de CD4 est estimée à 50-75 CD4/mm³/an. L'activation permanente des cellules immunocompétentes a des conséquences délétères sur les systèmes cardiovasculaires, rénaux, osseux... (46).

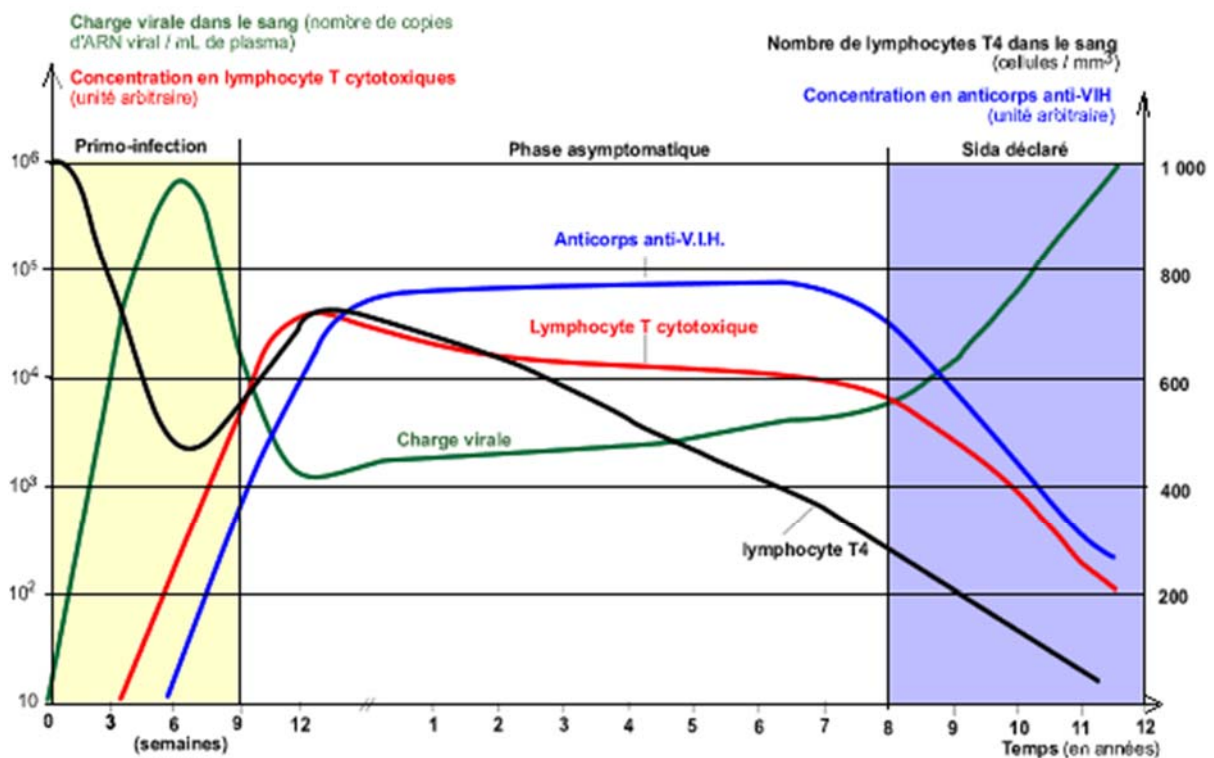


Figure 6 : Evolutivité de la charge virale et des anticorps anti-VIH1 au cours du temps

4.3. Stade SIDA

Au cours de l'évolutivité de la pathologie, les organes lymphoïdes primaires deviennent sénescents, libèrent des lymphocytes CD4 déficients et en faible quantité, ce qui entraîne une accélération de la réplication virale (Figure 6). Cette charge virale croissante est considérée comme responsable de la disparition progressive des lymphocytes T CD4 par des mécanismes directs (effet cytopathogène du VIH pour les cellules CD4+) et indirects (activation permanente des cellules immunitaires) (46).

En 1993, le CDC a établi une liste d'événements classant le sujet en stade SIDA (Annexe 1). Le risque de survenue des infections opportunistes ou d'un autre événement classant SIDA est majoré quand le taux de CD4 est $< 200 /\text{mm}^3$ (47)

Ces différents événements peuvent être :

- des signes directement liés à la réplication virale ou à des atteintes spécifiques du VIH (ex : encéphalite à VIH) ;
- des infections opportunistes majeures liées à l'immunodépression intense (ex : pneumocystose, toxoplasmose disséminée, rétinite à CMV ...) ;
- des manifestations tumorales (ex : maladie de Kaposi, liée à la réactivation de HHV8).

L'histoire naturelle de l'infection par le VIH-1 a donné lieu à une classification en stades par le CDC en 1993. Cette classification est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Classification de l'infection VIH pour les adultes (d'après le CDC, 1993)

	Catégories cliniques		
	A	B	C
Nombre de lymphocyte T CD4	Asymptomatique, primo-infection ou lymphadénopathie persistante généralisée	Symptomatique, sans critère A ou C	SIDA
$> 500 / \text{mm}^3$	A1	B1	C1
$200-499 / \text{mm}^3$	A2	B2	C2
$< 200 / \text{mm}^3$	A3	B3	C3

5. Notion de réservoir

Une trithérapie adaptée permet de diminuer la réplication virale jusqu'à la négativation de la charge virale plasmatique. Cependant, le VIH-1 est capable de persister dans des cellules hôtes spécifiques constituant le réservoir (48,49). L'interruption du traitement entraîne un rebond virologique (48,49). Les cellules constituant le réservoir sont principalement les lymphocytes T CD4+ mémoires quiescents, mais aussi les macrophages et les cellules dendritiques au niveau des ganglions, de la muqueuse intestinale, du système nerveux central et du tractus urogénital. Certaines de ces cellules contiennent des virus capables de se répliquer mais la plupart contiennent des virus défectifs (43,50).

Le réservoir se constitue très rapidement après le début de l'infection (43,51). La quantification de l'ADN proviral permet d'estimer la taille de ce réservoir (52). Cette valeur a

un impact pronostique au moment de la primo-infection sur l'évolution immunologique et clinique : un taux élevé d'ADN proviral est prédictif d'une progression rapide chez les patients non traités (42,43). C'est pourquoi le traitement antirétroviral est recommandé dès la découverte de la séropositivité (2).

Les particules virales contenues dans les cellules du réservoir sont insensibles aux ARV et non reconnues par le système immunitaire (53). Le réservoir est un obstacle majeur à l'éradication du VIH dans l'organisme (54–56).

6. Notion de tropisme

Les deux principaux corécepteurs du VIH-1 sont CCR5 et CXCR4. Les souches virales peuvent être schématiquement classées selon leur tropisme préférentiel pour CCR5 (souche R5) ou CXCR4 (souche X4). En début d'infection, la majorité des souches virales est de type R5 avec un tropisme préférentiel pour les macrophages. Au fur et à mesure de l'évolution la maladie, on retrouve une proportion plus importante de virus à tropisme lymphocytaire (virus X4), plus cytopathogènes, qui peuvent aller infecter les lymphocytes T mémoires et naïfs. Certains virus sont capables d'utiliser indifféremment les deux corécepteurs, on dit qu'ils ont un tropisme double (souche R5X4). Un même échantillon peut contenir des virus à tropisme R5 et d'autres à tropisme X4 ; on parle alors de tropisme mixte (57–59). Autrefois, les virus étaient classés selon leur capacité à former des syncytia (virus X4 ou X4R5) ou non (R5) (60).

II. Diagnostic et traitement de l'infection par le VIH

Aujourd'hui, alors que des traitements efficaces sont disponibles, il est important de connaître le plus tôt possible le statut sérologique vis-à-vis du VIH-1 ; cela a une importance à l'échelle individuelle et à l'échelle collective. Pour le patient, une prise en charge précoce prévient l'évolution de la maladie vers le stade SIDA et augmente l'espérance de vie. L'intérêt collectif est aussi important car la connaissance de l'infection permet aux patients de réduire les comportements à risque et la contamination d'autres personnes. Le dépistage du VIH est volontaire et nécessite le consentement éclairé du patient, la remise des résultats est confidentielle. Ils lui seront remis par le médecin prescripteur accompagnés d'informations sur la prévention de la transmission de l'infection par le VIH, et en cas d'infection nouvellement diagnostiquée, permettra le début de la prise en charge et le suivi du patient.

1. Diagnostic de l'infection par le VIH-1

1.1. Cinétique d'apparition des marqueurs anti-VIH1

La connaissance de la cinétique d'apparition des marqueurs VIH est importante pour une prescription adaptée des examens diagnostiques en fonction de la clinique et de l'interrogatoire du patient.

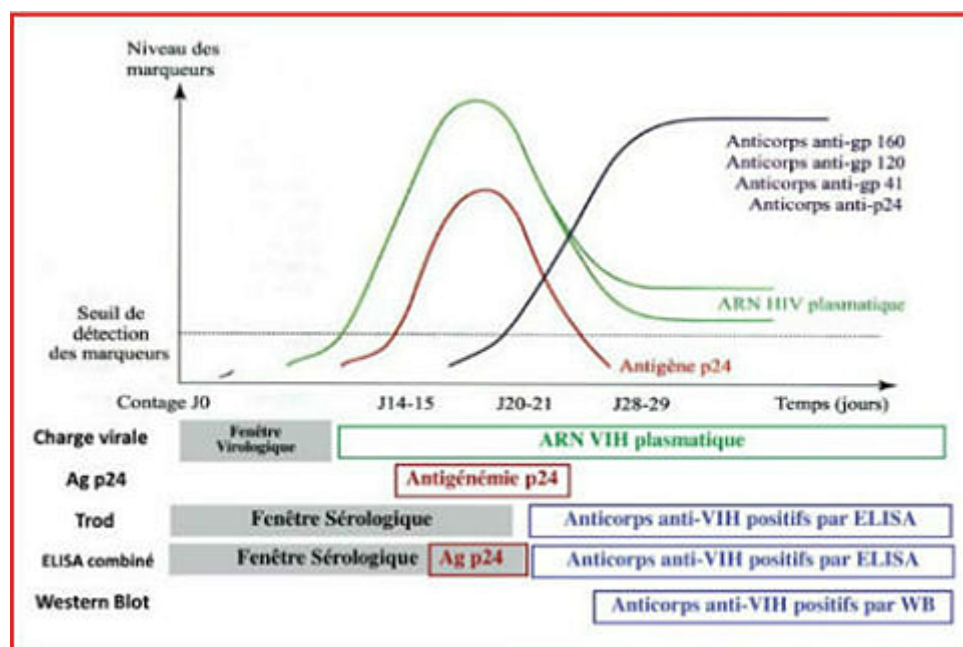


Figure 7 : Cinétique d'apparition des marqueurs VIH-1

Après une phase initiale où la réplication du virus est limitée aux muqueuses et tissus lymphatiques, le virus est détectable à partir du 10^{ème} jour par quantification de l'ARN plasmatique. Avant ce délai, aucun moyen diagnostique ne permet aujourd'hui de détecter le virus : il s'agit de la fenêtre virologique. Le pic de virémie est observé entre le 15^{ème} et le 21^{ème} jour après l'infection et peut atteindre des taux plasmatiques de plusieurs millions de copies d'ARN/mL. Ce pic est suivi d'une phase de décroissance spontanée correspondant à la clairance virale par l'activation de la réponse immunitaire. Par la suite, la réplication virale diminue et se stabilise à une valeur plateau correspondant à l'équilibre entre la production et la clairance virale (30).

L'antigène p24 se positive lors de l'apparition des premiers signes cliniques (environ 15 jours après le contage) et le reste pendant une à deux semaines tandis que les premiers anticorps anti-VIH1 dirigés contre les protéines structurales du VIH, telles que la gp120, la gp41 et la gp 160, apparaissent vers le 21^{ème} jour (46).

Cette cinétique est variable en fonction de chaque patient, de la souche infectante et d'un éventuel traitement antirétroviral mis en place dans le cadre d'un accident d'exposition.

1.2.Stratégie diagnostique

Selon les recommandations de la HAS 2009, le diagnostic biologique de l'infection à VIH-1 se réalise en deux temps : un test de dépistage puis un examen de confirmation. Si le test de dépistage se révèle positif, il doit obligatoirement être confirmé par un examen de confirmation sur le même échantillon. En cas de positivité de la confirmation, on devra réaliser un test de dépistage sur un deuxième échantillon afin d'éliminer une erreur d'identité. On ne pourra affirmer l'infection que si on obtient des résultats concordants sur les deux échantillons (61). L'algorithme de dépistage est présenté dans la figure ci-dessous.

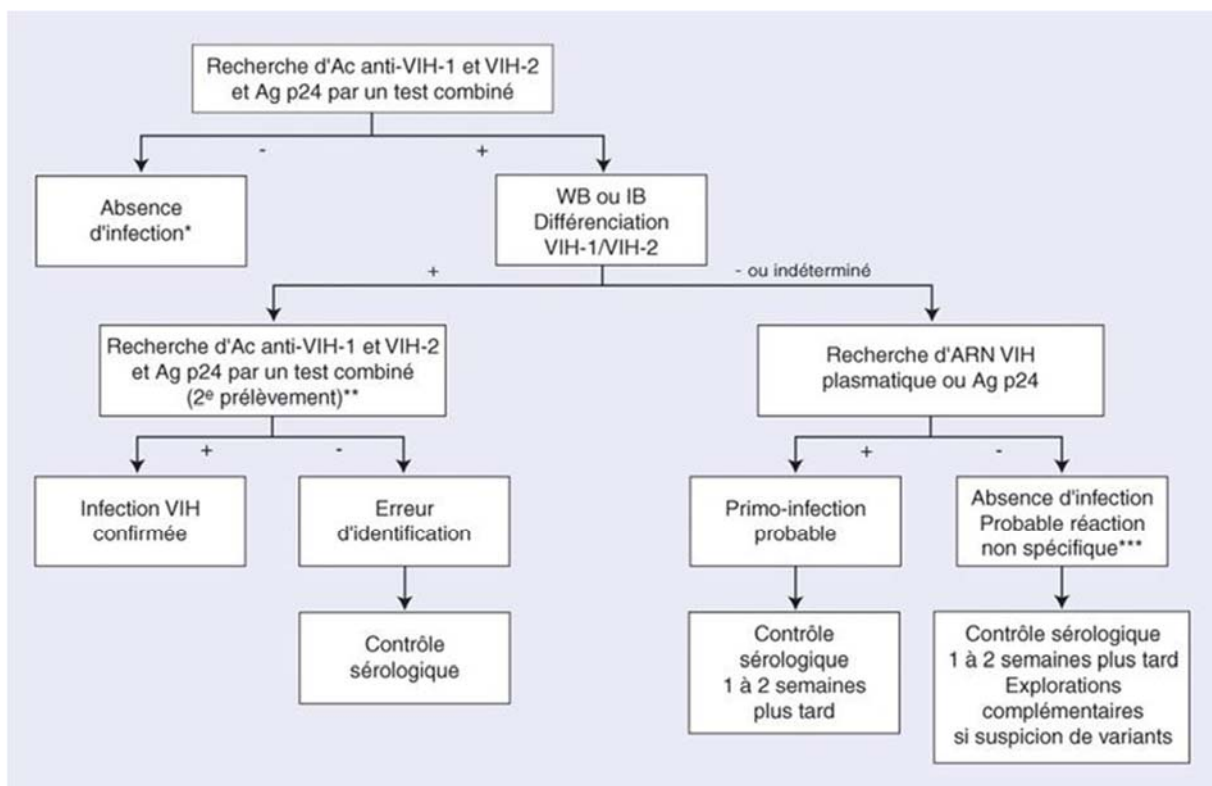


Figure 8 : Algorithme de dépistage de l'infection à VIH-1 chez l'adulte et l'enfant de plus de 18 mois (HAS 2009)

Pour l'analyse de dépistage, les biologistes doivent utiliser un test d'immuno-analyse de type ELISA combiné, marqué CE avec un seuil de détection de l'antigène p24 inférieur au seuil défini par la législation européenne (soit <math>< 50 \text{ pg /mL d'Ag VIH}</math>). Ce test ELISA est dit « combiné » car il permet le dépistage du VIH-1, du VIH-2 et de l'Ag p24. Si il est négatif, on peut exclure une infection par le VIH, sauf si l'exposition supposée au VIH date de moins de six semaines (61).

Les techniques de confirmation utilisées sont le Western blot (WB) ou l'Immunoblot (IB). Elles permettent aussi de différencier les infections par le VIH-1 de celles du VIH-2. Cette

distinction est importante en raison de la différence de pathogénicité des deux types de virus, de la résistance naturelle du VIH-2 à certains ARV, et de l'absence de tests commercialisés pour la quantification plasmatique de l'ARN du VIH-2. Si le résultat du WB ou de l'IB est négatif ou indéterminé, il est nécessaire d'effectuer une détection de l'ARN plasmatique du VIH-1 ou de l'Ag p24.

Afin de faciliter l'accès au dépistage, des tests de diagnostic rapide ou des autotests sont disponibles dans certains cas particuliers. Par exemple, en cas d'urgence (accident d'exposition aux virus, accouchement non programmé lors d'une grossesse sans suivi...) ou pour faciliter l'accès à la connaissance du statut sérologique aux populations qui ne recourent pas ou insuffisamment au dispositif classique de dépistage. Quel que soit le résultat de ces tests, un ELISA combiné devra être réalisé le plus rapidement possible (61).

2. Traitement de l'infection par le VIH-1

2.1. Indications et objectifs du traitement antirétroviral

Le traitement par trithérapie antirétrovirale est indiqué dès la découverte de la séropositivité pour le VIH ; indépendamment de la présence de symptômes, du taux de CD4 et de la charge virale (même au stade de primo-infection) (2).

Cette attitude s'appuie sur de nombreux arguments. Premièrement, l'impact du traitement antirétroviral sur le réservoir est supérieur quand il est débuté en primo-infection plutôt qu'à la phase chronique (62,63). Deuxièmement, le délai médian de rebond virologique est d'autant plus tardif que le traitement a été initié précocement (64). Enfin, une instauration précoce d'ARV permet de préserver les lymphocytes T CD4 et serait associé à une diminution transitoire du point d'équilibre de la charge virale en cas d'arrêt thérapeutique (63,65,66). Néanmoins, le bénéfice obtenu sous traitement n'est pas maintenu en cas d'arrêt thérapeutique, ce qui constitue un argument pour poursuivre le traitement à distance de la primo-infection (67,68).

Les objectifs du traitement sont :

- virologique : obtenir une charge virale indétectable de manière prolongée ;
- immunologique : préserver ou restaurer un nombre élevé de lymphocytes T CD4 ($>500/\text{mm}^3$) ;
- et clinique : améliorer les symptômes de la primo-infection et diminuer leur durée.

2.2.Rappel sur les différentes classes d'antirétroviraux (ARV)

2.2.1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

(1) Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Les INTI sont à la fois substrats et inhibiteurs de la TI. Après phosphorylation par des enzymes cellulaires, ils vont être intégrés dans la chaîne d'ADN viral en formation et arrêter son élongation par un effet terminateur de chaîne. Ils ont une plus grande affinité pour la TI que pour l'ADN polymérase cellulaire (69,70).

Les différents INTI commercialisés en France sont la zidovudine (AZT, Retrovir®), la stavudine (d4T, Zerit®), l'abacavir (ABC, Ziagen®), la didanosine (ddl, Videx®), la lamivudine (3TC, Epivir®), le tenofovir (TDF, Viread®) et l'emtricitabine (FTC, Emtriva®).

(2) Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Les INNTI bloquent la TI en se fixant au niveau d'une poche hydrophobe étroite et proche du site actif de l'enzyme (32,69). Les molécules commercialisées sont la névirapine (NVP, Viramune®), l'efavirenz (EFV, Sustiva®), l'étravirine (ETR, Intelence®) et la rilpivirine (RVP, Edurant®).

2.2.2. Les inhibiteurs de la protéase (IP)

Les IP sont des peptido-mimétiques, ils se fixent sur le site actif de la protéase virale, et l'empêchent de catalyser le clivage des polypeptides du virus (71). Les IP commercialisés sont le saquinavir (SQV, Invirase®), l'indinavir (IDV, Crixivan®), le nelfinavir (NFV, Viracept®), le lopinavir (LPV, Kaletra®), l'atazanavir (ATV, Reyataz®), le fosamprénavir (FPV, Telzir®), le darunavir (DRV, Prezista®), le tipranavir (TPV, Aptivus®), et le ritonavir (RTV, Norvir®) généralement utilisé comme booster.

2.2.3. Les inhibiteurs d'intégrase (II)

Les inhibiteurs de l'intégrase empêchent la ligation de l'ADN viral avec l'ADN cellulaire. Les II de première génération sont le raltégravir (RAL, Isentress®) et l'elvitégravir (EVG, Vitekta®) alors que le dolutégravir (DTG, Tivicay®) est un inhibiteur de deuxième génération.

2.2.4. Les inhibiteurs de fusion

L'enfuvirtide (T-20, Fuzéon®) se fixe sur la gp41 et empêche son réarrangement structural, et ainsi, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (72).

2.2.5. Les anti-CCR5

Les antagonistes de CCR5 agissent en inhibant l'entrée du VIH dans la cellule par effet allostérique après liaison au corécepteur CCR5 (73,74). Si la population virale est R5, on peut envisager un traitement par Celsentri (MVC, Maraviroc®).

2.2.6. Schémas thérapeutiques et recommandations

En 2016, le traitement initial comporte une association de deux inhibiteurs nucléotidiques ou nucléosidiques (INTI), en privilégiant le ténofovir associé à la lamivudine ou à l'emtricitabine. Le troisième agent peut-être un IP potentialisé par le ritonavir, un INNTI ou un II (75). Le choix de ces molécules est effectué en fonction de l'épidémiologie des souches virales transmises, de leur puissance virologique, et d'une éventuelle barrière de résistance aux ARV élevée. Le traitement sera ensuite adapté en cas d'apparition de résistance, pour simplifier le schéma thérapeutique et/ou pour diminuer les effets indésirables à long terme.

2.3. Suivi virologique du traitement

2.3.1. Mesure de la charge virale

Le traitement initial doit permettre l'obtention d'une charge virale indétectable à M6 (éventuellement retardée jusqu'à M12 si la charge virale initiale est élevée). Il est recommandé de vérifier que cet objectif est atteint par des mesures répétées de la charge virale plasmatique. A M1, on doit avoir une diminution d'au moins de 2 log₁₀ copies /mL et à M3, la charge virale doit être inférieure à 400 copies /mL. Le non-respect de ces objectifs intermédiaires témoigne presque toujours d'une mauvaise observance, et parfois d'interactions médicamenteuses ou d'un sous dosage, qui doivent être recherchés (2,75).

Il faut ensuite renouveler cette quantification tous les trois mois, sauf en cas de difficultés particulières. En cas de rebond de la charge virale, il faut contrôler les résultats par une 2^{ème} mesure avant de décider d'un éventuel changement thérapeutique. En effet, des « blips », correspondants à des charges virales de faible valeur (< 1 000 copies /mL) transitoirement détectables, sont parfois observés au cours du suivi des patients. Ils ne doivent pas être interprétés comme un échec virologique.

2.3.2. Etude de la résistance aux antirétroviraux

(1) Introduction du concept

La variabilité génétique du VIH entraîne chaque jour l'apparition de mutations sur le génome viral, notamment au niveau des gènes cibles des antirétroviraux (36–38). La persistance d'une réplication virale en présence d'antirétroviraux conduit au développement de la résistance antivirale. En effet, les mutants résistants, préexistants à l'instauration de la thérapie, vont être rapidement sélectionnés et devenir la population virale prédominante (76,77). Les mutations sont plus ou moins rapidement sélectionnées selon les antirétroviraux utilisés. Ainsi, certains antirétroviraux ont une faible barrière génétique : une seule mutation suffit à conférer au virus un niveau élevé de résistance. D'autres antirétroviraux ont une barrière génétique élevée et c'est l'accumulation de plusieurs mutations qui entraîne la résistance. Cette résistance peut être croisée à plusieurs molécules au sein de la même classe thérapeutique. La meilleure prévention de l'apparition de résistance consiste à obtenir de manière rapide et durable une charge virale plasmatique indétectable (2).

(2) Méthodes d'étude de la résistance aux antirétroviraux

Deux types de tests permettent de déterminer la résistance du VIH aux antirétroviraux : les tests phénotypiques et les tests génotypiques.

Les tests phénotypiques mesurent la capacité du virus à se multiplier *in vitro* en présence d'un antirétroviral, et permettent de définir les concentrations inhibitrices 50% (CI50) et 90% (CI90). La résistance phénotypique est mesurée par l'index de résistance (rapport de la CI50 de la souche testée sur la CI50 d'une souche sensible de référence). Aujourd'hui, les tests phénotypiques sont basés sur la production de virus recombinants à partir de l'ARN viral plasmatique (Antivirogram[®], Trofile[®], et Phenoscript[®]). Ces tests sont réservés à certains protocoles spécifiques du fait de leur complexité de mise en œuvre : la nécessité d'infrastructures et de personnels spécialisés, un délai élevé de rendu des résultats (2 à 4 semaines) et un coût élevé.

Actuellement, les tests génotypiques sont largement répandus. Ils consistent à séquencer les gènes cibles, et à comparer par alignement la séquence obtenue avec une séquence de référence afin d'identifier des mutations décrites comme étant associées à une résistance aux antirétroviraux.

De façon similaire, l'utilisation des corécepteurs (et donc la sensibilité au Maraviroc®) peut être prédite par le séquençage de la boucle V3 de la gp120, considérée comme le principal déterminant de la liaison du virus au corécepteur. Plusieurs algorithmes et règles permettent ainsi de classer le virus en R5, X4, ou R5X4.

Le génotypage de résistance est détaillé dans le chapitre suivant.

III. Génotypage de résistance du VIH-1

1. Indications

Le groupe d'expert du Pr Morlat recommande la prescription d'un test génotypique de résistance (2) :

- lors du diagnostic de l'infection à VIH ou lors du dernier prélèvement disponible avant de débiter le traitement (4). L'identification précise du sous-type de VIH-1 devra accompagner le premier résultat de génotypage.
- en cas d'échec virologique, en s'assurant que le patient est toujours sous ARV au moment du prélèvement.

La détermination du tropisme et l'analyse du gène de l'intégrase ne seront réalisées que si un traitement par les molécules cibles est envisagé.

2. Tests génotypiques de résistance

Les prémices du séquençage débutent dès les années 1970 avec la technique de terminaison de chaîne mise au point par Frederick Sanger (78). Après quelques évolutions, elle est aujourd'hui encore, la méthode de référence pour la détection de mutations de résistance aux antirétroviraux. Cependant, cette technologie a ses limites, notamment une sensibilité insuffisante pour détecter une mutation ou un variant présent à moins de 20% de la population virale étudiée (15–17).

Depuis plusieurs années, de nouvelles techniques de séquençage, dites de « nouvelle génération », ont fait leur apparition. Elles ont pour point commun de fournir un grand nombre de données en quelques heures avec un seuil de sensibilité pouvant aller jusqu'à 0,1-1%. On peut donc détecter, avec une bonne profondeur, des mutations de résistance sur des populations minoritaires (79,80).

Le principe, ainsi que les avantages et inconvénients de ces différentes techniques, sont présentés ci-dessous.

2.1. Le séquençage Sanger

La méthode Sanger utilise des didésoxyribonucléotides (ddNTPs) ayant comme particularité de ne pas posséder de groupement -OH à leur extrémité 3' ; ce qui leur confère un effet terminateur de chaîne. En effet, lors de l'élongation, les dNTPs initialement présents dans l'ADN et les ddNTPs vont s'hybrider aléatoirement. A la fin de la réaction, on obtient des fragments de tailles variables, correspondant à l'arrêt de la synthèse pour chacun des sites d'incorporation du ddNTP (Figure 9). Par le passé, la séquence d'ADN était déduite par migration des fragments sur gel d'agarose.

L'automatisation de cette méthode, avec le développement des ddNTPs marqués par quatre fluorochromes (81) et l'électrophorèse capillaire (82) a permis son utilisation en diagnostic de routine. L'interprétation de la séquence nucléotidique se fait grâce à des logiciels.

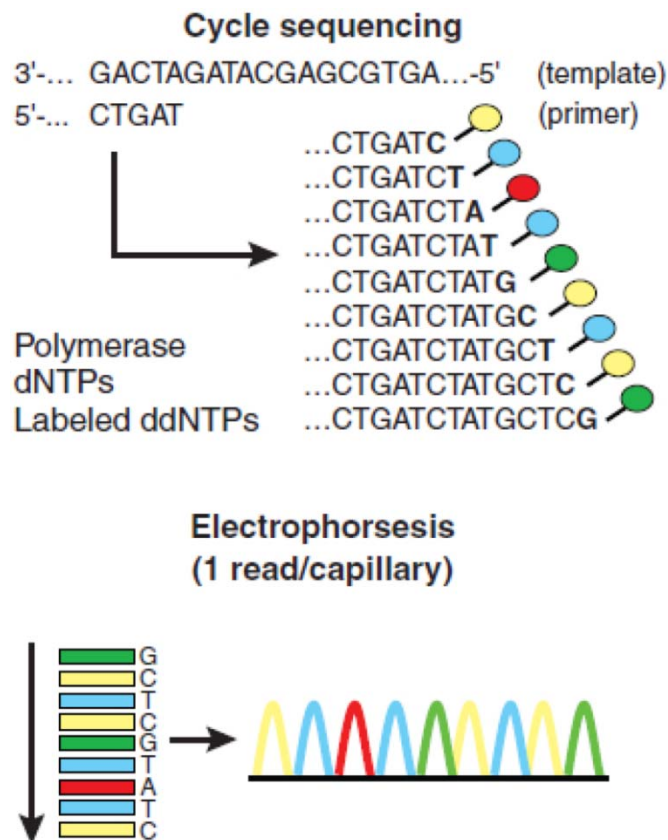


Figure 9 : Principe de la méthode séquençage Sanger (d'après Leong et al, 2014) (83)

2.2. Le séquençage de nouvelle génération (NGS)

Plusieurs plateformes de séquençage de nouvelle génération (ou séquençage à haut débit) ont été développées. Les principales étapes sont communes à toutes les plateformes disponibles :

- La constitution de la librairie (ensemble des fragments du génome cible provenant d'un échantillon). Le multiplexage de plusieurs échantillons au sein d'une même analyse est possible grâce à l'utilisation des MID (Multiplex Identifier). Les MID sont de courtes séquences spécifiques « code barre » d'un échantillon ;
- l'amplification clonale : elle s'effectue soit sur microbille lors d'une PCR en émulsion (technologie 454 et Ion Torrent®), soit sur une surface plane solide (Illumina®) ;
- le séquençage : lors de la réaction de séquençage, le signal émis par l'incorporation des nucléotides est de nature physique par émission de fluorescence (Illumina®) ou chimique par détection d'une variation de pH (Ion Torrent®).

Les caractéristiques des trois principales plateformes actuellement commercialisées sont présentées ci-dessous.

2.2.1. La technologie 454 (Roche®)

La technologie 454 est une évolution du pyroséquençage mise au point en 2005 par *Margulies et al* (84). Après constitution de la librairie, l'amplification clonale a lieu sur une microbille lors de la PCR en émulsion. Les billes chargées d'ADN sont déposées sur une plaque PTP (Pico Titer Plate) pour le pyroséquençage. Les nucléotides sont ajoutés de façon cyclique. Lorsqu'une nouvelle base est incorporée, il y a libération d'un pyrophosphate inorganique (PPi) qui sera transformé en ATP. Cet ATP est ensuite capté par la luciférase et entraîne une émission de lumière. L'intensité du signal lumineux est proportionnelle au nombre de bases intégrées, il est détecté par un capteur CDD (Charge-Coupled Device ou en français, dispositif à transfert de charge, DTC) et les résultats sont présentés sous forme d'un pyrogramme. Le principe est détaillé dans la Figure 10.

Le principal inconvénient de cette technologie est sa faible précision (dix fois plus faible que le Sanger), surtout au niveau des homopolymères, car on a une perte de la relation de linéarité entre l'intensité lumineuse émise et le nombre de nucléotides incorporé (84–86). De manière moins fréquente, on peut avoir une erreur de séquençage (insertions/délétions) par détection d'un signal provenant d'un puits adjacent ou lorsque le signal lumineux émis pour un seul nucléotide est inférieur au seuil de détection (79,85,87).

2.2.2. La technologie Ion Torrent®

La technique Ion Torrent® est assez proche de la précédente. L'originalité de cette méthode repose sur son mode de détection. Les fragments d'ADN sont amplifiés sur une microbille par PCR en émulsion, puis le séquençage est effectué sur une puce contenant un semi-conducteur sous chaque micro-puit. Les nucléotides sont apportés de manière séquentielle, à chaque incorporation d'une nouvelle base, il y a libération d'un proton H^+ . Cela va entraîner une diminution du pH dans le milieu et créer une différence de potentiel détectée par le semi-conducteur. L'intensité du signal est proportionnelle au nombre de bases incorporées (88).

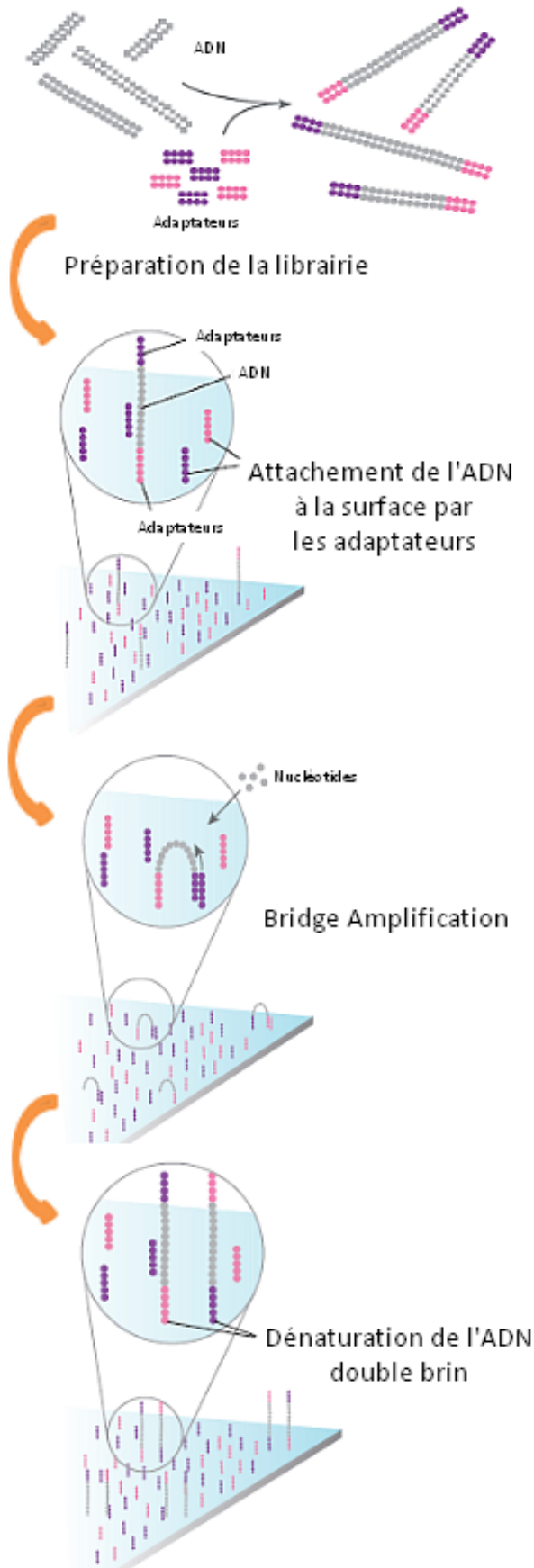
2.2.3. La technologie Illumina®

Dans cette technique, l'amplification de l'ADN ne s'effectue pas en solution mais sur un support solide. Les sondes fixées sur ce support sont complémentaires des adaptateurs liés aux extrémités des brins d'ADN et vont permettre leur capture. Ceux-ci vont ensuite former un pont entre deux sondes de la plaque. A chaque cycle de PCR, il y a dénaturation des fragments amplifiés de double à simple brin, ce qui leur permet de s'hybrider sur une nouvelle sonde de la plaque et de former un nouveau pont. L'amplification a ainsi lieu de proche en proche jusqu'à former des groupements de séquences identiques ou « clusters ». La réaction de séquençage est réalisée sur ce même support. On utilise des nucléotides modifiés (termineurs de chaîne) marqués par des fluorochromes. A chaque cycle de séquençage, un seul nucléotide est intégré par fragment en cours de synthèse. Il se déroule de manière séquentielle, en commençant par l'ajout d'une base, puis l'acquisition d'image par une caméra CDD et enfin le clivage chimique du groupement terminateur et du marquage fluorescent pour le cycle suivant (18,19). Le principe est détaillé dans la Figure 11.

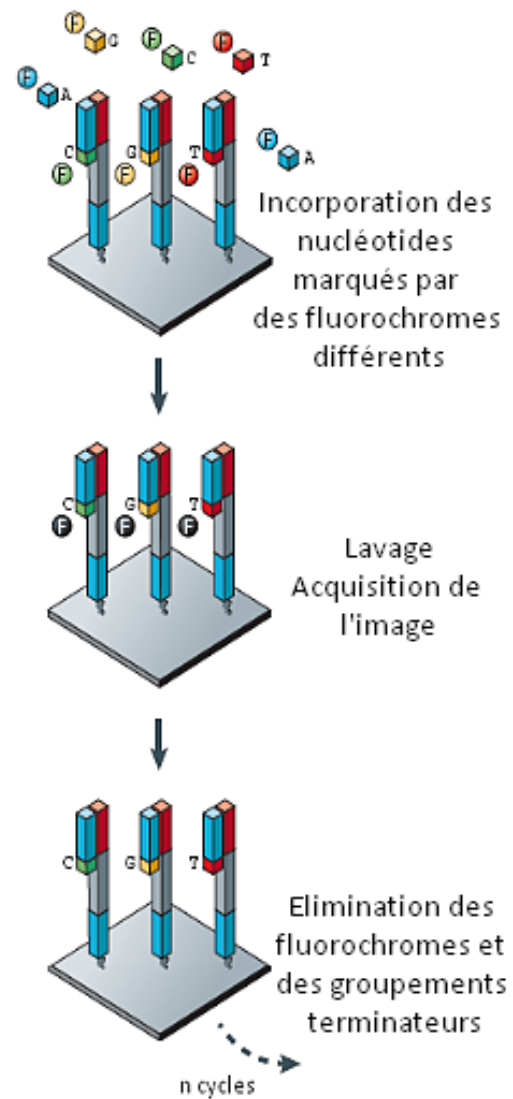
Etant donné que les nucléotides utilisés ont une fonction terminatrice, les bases sont détectées l'une après l'autre, il n'y a pas d'erreur au niveau des séquences homopolymériques mais plutôt des erreurs de substitution d'une base par une autre (89).

La Figure 12 présente un comparatif des trois principales technologies de séquençage à haut débit.

A. Préparation de la librairie et "Bridge Amplification"



B. Séquençage



C. Images



Figure 11 : Principe détaillé de la technologie Illumina® (d'après Mardis, 2013 et Metzker, 2010) (18,19)

Séquenceurs de 2 ^{ème} génération						
Technologie	Roche		Illumina		Thermo Fisher	
	GS Junior +	454 FLX XL	MiSeq	HiSeq 2500	Ion PGM 318	Ion Proton
	Acides nucléiques (matrice)					
	Ligation d'adaptateurs					
Méthode d'amplification	PCR en émulsion		« Bridge PCR »		PCR en émulsion	
Méthode de séquençage	Pyroséquençage		Synthèse		Ligation	
Applications	Petit génome		Petit génome Exome Ciblé Chip-Seq	Grand génome Exome Transcriptome Métagénomique	Petit génome Ciblé Chip-Seq	Petit génome Exome Transcriptome Chip-Seq
Durée du Run (h)	10	23	24	40	7,3	2-4
Taille des Reads (pb)	400	700	2×150	2×150	400	200
Nombre de Reads max	100000	1 million	25 millions	600 millions	5,5 millions	60-80 millions
Taille insert (pb)	700 - 1000		150 - 1000		200 - 400	
Avantages	Longueur des Reads Rapidité		Le plus répandu, nombreux outils bioinformatiques		Prix Rapidité Débit flexible (#taille de puces)	
Inconvénients	Difficulté de séquençage des homopolymères		Peu de capacité de multiplexage Erreur de substitution		Difficulté de séquençage des homopolymères Peu d'outils développés	

Figure 12 : Comparatifs des différentes techniques de séquençage de 2^{ème} génération

3. Principales mutations associées à des résistances aux antirétroviraux

La liste des mutations associées à la résistance aux antirétroviraux, utilisée en pratique en France, est disponible sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org/>. Elle est régulièrement mise à jour par le groupe AC11 de l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales). Quelques mutations importantes sont décrites ci-dessous.

3.1. Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de la transcriptase inverse

3.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Les mutations TAMs (Thymidine Analog Mutations) : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E entraînent l'excision de l'analogue nucléosidique incorporé. Elles favorisent l'accès de l'ATP au site de polymérisation qui réagit avec l'analogue nucléosidique en le détachant de la chaîne d'ADN viral en formation. Les TAMs sont responsables d'une résistance, à divers niveaux, à l'ensemble des INTI. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAMs et du type de mutation observée (90–92).

Les autres mutations entraînent une diminution de l'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit des nucléotides naturels. La mutation Q151M ainsi que son complexe (mutations A62V, V75I, F77L, F116Y et Q151M) agissent par ce mécanisme et sont à l'origine d'une résistance croisée à tous les INTI, à l'exception du tenofovir (69,92). Ce même mécanisme est décrit pour la mutation M184V ; à l'origine d'une résistance de haut niveau à la lamivudine et à l'emtricitabine (69,93).

3.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Une seule mutation au niveau de la poche hydrophobe peut entraîner une résistance de haut niveau aux INNTI avec une résistance croisée entre l'efavirenz, la névirapine et la rilpivirine (K103N, Y181C et E138K) (69). Ce sont typiquement des molécules vis-à-vis desquelles la barrière génétique est basse puisqu'une seule mutation leur confère généralement une résistance élevée. Les profils de résistance de l'étravirine et de la rilpivirine sont très similaires, avec une forte résistance croisée entre les deux molécules. De

plus, l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI diminue fortement l'efficacité de l'étravirine et probablement de la rilpivirine (94).

Environ 10% des virus de sous-types non B possèdent au moins une résistance à l'étravirine et à la rilpivirine dans le score de résistance établi pour les virus de sous-type B (95).

3.2.Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de la protéase

La résistance aux IP est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations. Sous traitement, on distingue les mutations primaires sélectionnées en premier lors d'un échappement virologique, et les mutations secondaires qui s'accumuleront ensuite et renforceront la résistance. Certaines mutations primaires sont spécifiques d'un IP, c'est le cas de la mutation I50L, sélectionnée par l'atazanavir chez des patients naïfs (96).

Chez des patients ayant déjà reçu d'autres IP, d'autres mutations vont être sélectionnées, en particulier la mutation I84V, responsable de résistance croisée aux IP. Les autres IP, comme l'indinavir, le saquinavir et le lopinavir, peuvent sélectionner des mutations responsables de résistance croisée, en particulier les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M, qui lorsqu'elles sont associées, rendent difficile le choix d'un traitement de relais.

La protéase des sous-types non B, du fait de son polymorphisme naturel, peut présenter à certaines positions des acides aminés décrits comme des mutations de résistance chez les VIH-1 de type B.

3.3.Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de l'intégrase

La résistance aux II de 1^{ère} génération (raltégravir et elvitégravir) est principalement due à la sélection d'un des trois profils de mutations majeures N155H, Y143C/H/R ou Q148K/R/H (97). Ces deux molécules présentent une résistance croisée quasi-absolue. Une réplication résiduelle sous traitement comportant un II favorise l'apparition de mutations secondaires et peut compromettre la possibilité d'un traitement de relais par le dolutégravir, inhibiteur de 2^{ème} génération (98).

3.4.Mutations entraînant des résistances aux inhibiteurs de fusion

Les phénomènes de résistances aux inhibiteurs de fusion sont associés à des changements des AA 36 à 45 du domaine HR1 de la gp41 (99,100).

3.5. Mutations entraînant des résistances aux anti-CCR5

La résistance au Maraviroc est le plus souvent provoquée par l'émergence d'une sous-population X4 minoritaire à l'installation du traitement, ou plus rarement par l'émergence de virus R5 résistants à l'anti-CCR5 (101).

4. Outils d'interprétation

L'interprétation des tests génotypiques est complexe. Afin d'aider les professionnels et les organismes de santé, des algorithmes d'interprétation de résistances aux antiviraux ont été développés. Ils peuvent être divisés en deux groupes :

- Ceux qui reposent sur les publications scientifiques associant une mutation ou une combinaison de mutations à des résistances. Stanford (Etats-Unis), ANRS (France), Rega (Belgique) et Grade (Allemagne) en sont quatre exemples reconnus et ces algorithmes sont largement utilisés à travers le monde. En France, les professionnels de santé suivent les recommandations de l'ANRS, disponibles sur le site : <http://www.hivfrenchresistance.org/table.html>. Ils permettent de classer chaque souche comme « sensible », « intermédiaire » ou « résistante » vis-à-vis de chaque molécule mise sur le marché ;
- et ceux basés sur l'apprentissage statistique : ils utilisent l'intelligence artificielle afin de trouver un modèle mathématique pour établir une corrélation prévisible entre les données génotypiques et phénotypiques aussi appelé « phénotypage virtuel ». Ces tests sont souvent utilisés pour la détermination du tropisme viral grâce à des machines à vecteur de support (SVM), par exemple Geno2pheno ou PSSM (*Position specific scoring matrices*). Le Geno2pheno est basé sur un ensemble de séquences nucléotidiques correspondant à des virus R5, X4 ou R5X4. Il réalise un alignement de V3 sur la séquence de référence HXB2 et prédit le type de corécepteur utilisé par le virus. Le taux de faux positifs (false positive rate ou FPR) définit la probabilité de classer de façon incorrecte une souche R5 en X4. Geno2pheno est accessible en ligne sur le site : <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>. Les matrices de score avec positions spécifiques (PSSM) se basent sur l'assignation d'un score à la séquence analysée, qui décrit sa probabilité de présenter un tropisme ou un autre. Deux matrices sont disponibles pour la prédiction du tropisme. La matrice X4R5, qui repose sur une base de séquence V3 de tropisme connu en méthode phénotypique, permet de différencier les trois types de virus. La matrice SINSI détermine la probabilité pour le virus d'induire un syncytium (virus X4 ou R5X4) ou non (R5) (102).

L'accès à cet algorithme se fait via le site suivant :

<https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>.

Ces algorithmes ont montré une bonne concordance avec les tests phénotypiques (variable selon le sous-type viral) (103–105).

Partie 2 : Etude

I. Objectifs du travail

Objectif général :

Le présent travail a pour but de comparer le séquençage Sanger sur ADN et le séquençage à haut débit sur ARN, au séquençage Sanger sur ARN réalisé en routine pour le génotypage de résistance VIH-1 chez des patients naïfs.

Objectifs spécifiques :

- Décrire et comparer la détection des mutations de résistance présentes sur les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase et de l'intégrase, en utilisant les trois approches de séquençage ;
- Déterminer la corrélation entre les méthodes Sanger ARN et ADN dans la détermination du tropisme du VIH-1 ;
- Déterminer et comparer les profils de résistance aux antirétroviraux générés par les différentes méthodes de séquençage en utilisant trois différents outils d'interprétation ;
- Analyser l'impact à court terme des variants minoritaires de résistance, générés par le séquençage à haut débit, sur le traitement antirétroviral instauré.

II. Matériels et méthodes

1. Sélection des patients et échantillons

Cette étude a inclus des patients infectés par le VIH-1 et suivis dans le service universitaire de maladies infectieuses du centre hospitalier de Tourcoing. Tous les patients ont signé la charte d'éthique de la base de données électronique Nadis® contenant les informations des patients. Les patients inclus dans ce travail sont des patients naïfs de tout traitement antirétroviral, ayant bénéficié d'un génotypage de résistance au laboratoire de virologie de Lille durant la période du 03/10/2013 au 12/06/2015, et pour lesquels un échantillon de plasma et un échantillon de sang total sont disponibles. Les données cliniques et démographiques des patients ont été collectées rétrospectivement à partir de la base de données Nadis®.

2. Séquençage par méthode de Sanger

Le séquençage ARN a été réalisé lors de la prise en charge en routine de l'échantillon. Le séquençage ADN a été réalisé dans un deuxième temps. Tout le processus technique a été réalisé selon les recommandations de l'ANRS. Le séquençage de population a été réalisé sur les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de l'intégrase, ainsi que sur la boucle V3 de la gp120 pour la détermination du tropisme. Les séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 2. Les différentes étapes techniques sont détaillées ci-après.

2.1.Extraction des acides nucléiques

2.1.1. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN a été réalisée avec la trousse Qiagen® QIAamp® Viral RNA Mini kit à partir de 140 µL de plasma en suivant le protocole du fournisseur. L'échantillon est d'abord lysé dans des conditions très dénaturantes pour inactiver les RNases et isoler l'ARN viral. Il est ensuite chargé sur des colonnes à membrane de silice. Lors de la centrifugation, l'ARN se lie à la membrane et les contaminants sont éliminés lors des lavages. Lors de l'élution, on récupère un extrait de 60 µL contenant l'ARN purifié.

2.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN contenu dans les cellules mononuclées sanguines a été réalisée à partir de 200 µl de sang total selon le protocole de la trousse NuclSpin® Blood de Macherey-Nagel® (colonnes de silice). Cette méthode utilise la propriété des acides nucléiques à former des liaisons hydroxyles avec la silice en milieu alcoolique. Le volume de l'éluat est de 100 µL.

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour le séquençage par méthode Sanger (ANRS 2015)

Région	Etapes	Nom de l'amorce	Séquence	Taille des produits générés
Protéase	PCR/RT-PCR	5'PROT1	5'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'	652 pb
		3'PROT1	5'-GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG-3'	
	Nested-PCR+ séquençage	5'PROT2	5'- TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'	507 pb
		3'PROT2	5'- AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC-3'	
RT	PCR/RT-PCR	MJ3	5'-AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA-3'	950 pb
		MJ4	5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'	
	Nested-PCR	A35	5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'	798 pb
		NE135	5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'	
	Séquençage	A20	5'-ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'	750 pb
NE120	5'-ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'			
GP120	PCR/RT-PCR	ENV8	5'-ATG GGA GGG GCA TAC ATT G-3'	586 pb
		ENV31	5'-CAG TAC AAT GTA CAC ATG G-3'	
	Nested-PCR+ séquençage	ENV7	5'-AAT GGC AGT CTA GCA GAA G-3'	373 pb
ENV33	5'-TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3'			
Intégrase	PCR/RT-PCR	INPS1	5'- TAG TAG CCA GCT GTG ATA AAT GTC- 3'	1264 pb
		INPR8	5'-TTC CAT GTT CTA ATC CTC ATC CTG-3'	
	Nested-PCR+ séquençage	INPS3	5'- GAA GCC ATG CAT GGA CAA G- 3'	1086 pb
		INPR9	5'-ATC CTC ATC CTG TCT ACT TGC C -3'	

2.2. Etape de rétro-transcription et PCR (RT-PCR) ou de PCR

Une RT-PCR a été réalisée sur les échantillons d'ARN alors que les extraits d'ADN ont été utilisés directement dans une première réaction de PCR. Ces étapes ont eu lieu sur des thermocycleurs Gene Amp® PCR System 2700 / 2720 (Applied Biosystems).

2.2.1. Rétro-transcription de l'ARN viral et PCR

L'enzyme utilisée est la Superscript III (Thermo Fischer Scientific). Les conditions réactionnelles sont présentées dans les tableaux 3 et 4 :

Tableau 3 : Mélange réactionnel utilisé pour la rétro-transcription par méthode Sanger

Réactifs RT-PCR	Volume en µL par puit				
	Région	Protéase	RT	Gp120	Intégrase
2x Reaction Mix		12,5	12,5	12,5	12,5
Superscript III		1	1	1	1
Amorce sens (10µM)	5'prot1	0,5	MJ3	ENV8	INPS1
		0,5	0,5	0,5	0,5
Amorce antisens (10µM)	3'prot1	0,5	MJ4	ENV31	INPR8
		0,5	0,5	0,5	0,5
Eau ppi		5,5	5,5	5,5	5,5
Volume total = 20 µL + 5 µL d'ARN extrait					

Tableau 4 : Conditions nécessaires pour la rétro-transcription par méthode Sanger

Etapes	Température	Durée	
Rétrotranscription	50°C	30'	
Dénaturation initiale	94°C	2'	
Dénaturation des brins d'ADN	94°C	15"	} 40 cycles
Hybridation des amorces	55°C	30"	
Elongation	68°C	1'	
Elongation finale	68°C	5'	
Fin	4°C	∞	

2.2.2. Réaction d'amplification par PCR (ADN)

L'enzyme utilisée provient de la trousse AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems). Les conditions réactionnelles sont présentées dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR

Réactifs PCR	Volume en μL par puit			
	Protéase	RT	Gp120	Intégrase
Tampon 10x	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP	1	1	1	1
Taq Polymérase	0,2	0,2	0,2	0,2
Amorce sens (10 μM)	5'prot1 0,5	MJ3 0,5	ENV8 0,5	INPS1 0,5
Amorce antisens (10 μM)	3'prot1 0,5	MJ4 0,5	ENV31 0,5	INPR8 0,5
Eau ppi	15,3	15,3	15,3	15,3
Volume total = 20 μL + 5 μL d'ADN extrait				

Tableau 6 : Conditions d'amplification pour la réaction de PCR

Etapes	Température	Durée	
Dénaturation initiale	94°C	2'	} 40 cycles
Dénaturation des brins d'ADN	94°C	15"	
Hybridation des amorces	55°C	30"	
Elongation	68°C	1'	
Elongation finale	68°C	5'	
Fin	4°C	∞	

La dénaturation initiale a pour but d'activer la Taq Polymérase et d'initier la dénaturation.

2.2.3. Etape de PCR nichée

Une PCR nichée, aussi appelée « Nested-PCR », est nécessaire pour augmenter le rendement, la sensibilité et la spécificité de la réaction. Elle est réalisée à partir des produits d'amplification précédents. L'enzyme utilisée provient de la trousse AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont différentes de celles de la première réaction ; les deuxièmes couples d'amorce se lient sur des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. Les conditions réactionnelles sont présentées dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 7 : Mélange réactionnel utilisé pour la nested-PCR

Réactifs PCR	Volume en μL par puit				
	Région	Protéase	RT	Gp120	Intégrase
Tampon 10x		2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP		1	1	1	1
Taq Polymérase		0,2	0,2	0,2	0,2
		5'prot2	A35	ENV7	INPS3
Amorce sens (10 μM)		0,5	0,5	0,5	0,5
		3'prot2	NE135	ENV33	INPR9
Amorce antisens (10 μM)		0,5	0,5	0,5	0,5
Eau ppi		17,3	17,3	17,3	17,3
Volume total = 22 μL + 3 μL du produit de PCR					

2.3.Purification

La purification est réalisée à l'aide des microplaques NucleoFast 96® (Macherey-Nagel®) par centrifugation. Cette étape est nécessaire après la Nested-PCR et après la réaction de séquence, afin d'éliminer les amorces et les dNTP en excès qui pourraient causer des interférences de fluorescence lors du séquençage, et par conséquent, des problèmes de lecture des séquences. Le principe est le suivant : les produits de PCR sont placés sur les puits. Après centrifugation, les impuretés (amorces, dNTP, sels...) seront éliminées alors que les ADN seront retenus sur la membrane. Après plusieurs étapes de lavage et une courte incubation avec de l'eau distillée, l'ADN purifié est récupéré.

2.4.Analyse des produits de PCR par électrophorèse

L'électrophorèse permet de valider l'amplification, la taille de l'amplicon et la pureté de l'ADN obtenu. L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 2 % après les deux premières réactions de PCR et la purification des amplicons. Un témoin de poids moléculaire est intégré au sein de chaque série afin de visualiser la taille des fragments obtenus.

2.5. Réaction de séquence et séquençage par méthode Sanger

Le séquençage de chaque brin d'ADN est réalisé par une technique basée sur la méthode de Sanger. Le séquençage se fait en trois étapes :

- marquage des séquences selon la technologie BigDye® Terminator (BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)). Le BigDye® Terminator (TRMM) est un mix des quatre ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) marqués à effet terminateur de chaîne ;
- purification des produits marqués à l'aide des microplaques NucleoFast 96® de Macherey-Nagel® ;
- séquençage sur l'automate 3500 Dx Genetic Analyzer® (Applied Biosystems®).

Les conditions réactionnelles sont présentées dans les tableaux 8 et 9 :

Tableau 8 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de séquence

Réactifs PCR	Volume en µL par puit							
	Région	Protéase		RT		Gp120		Intégrase
Amorce	5'prot2	3'prot2	A20	NE120	ENV7	ENV33	INPS3	INPR9
Tampon 10x	3	3	3	3	3	3	3	3
ddNTP	2	2	2	2	2	2	2	2
Amorce (0,8µM)	4	4	4	4	4	4	4	4
Eau ppi	7	7	7	7	7	7	7	7
Volume total = 16 µL + 4 µL du produit purifié de la PCR nichée								

Tableau 9 : Conditions réactionnelles pour la réaction de séquence

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	96°C	1'
Dénaturation	96°C	10''
Hybridation des amorces	50°C	5''
Elongation	60°C	4'
Fin	4°C	∞

} 25 cycles

3. Séquençage à haut débit de l'ARN viral plasmatique

Le séquençage a été réalisé grâce aux plaques « HIV-1 Drug Resistance Assay – Collaboration Initiative v3.0 » (Roche®) sur 454-GS Junior selon les recommandations du fournisseur.

3.1.Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN se fait selon la même technique que celle décrite pour le séquençage de l'ARN par méthode de Sanger. L'ARN extrait est purifié à l'aide des billes magnétiques Agencourt RNA clean XP® (Beckman Coulter®).

3.2.Préparation de la Librairie

3.2.1. Synthèse des ADNc

Les extraits purifiés sont déposés sur une plaque fournie par Roche® (cDNA primer plate®) contenant des amorces spécifiques. Après une étape de pré-rétrotranscription (10 min à 65°C) permettant d'activer les amorces, la rétrotranscription (60 min à 50°C puis 5 min à 85°C, et < 2h à 4°C) est effectuée avec le kit «Transcriptor First Strand cDNA Synthetisis kit® » pour obtenir les ADN complémentaires. A la fin du cycle, l'ajout de RNase H permet de lyser les fragments d'ARN non hybridés.

3.2.2. Génération des amplicons par PCR

La réaction d'amplification est réalisée grâce aux réactifs « FastStart High Fidelity PCR System » et les « amplicon primer plate », contenant des amorces spécifiques fixés au fond des puits, afin d'obtenir cinq amplicons par échantillons : quatre pour les gènes codant pour la protéase et la transcriptase (RTP_A, B, C et D) et un pour le gène codant pour l'intégrase (INT_X).

Pour chaque amplicon, la taille attendue est de 400 pb pour RTP_A, 418 pb pour RTP_B, 432 pb pour RTP_C, 434 pb pour RTP_D et 503 pb pour INT_X. Les adaptateurs, ainsi que les MIDs, permettant l'analyse de douze échantillons au sein d'un même *run*, sont intégrés durant cette PCR. Les conditions réactionnelles sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Conditions nécessaires pour la rétrotranscription pour le séquençage NGS

Etapes	Température	Durée	
Dénaturation initiale	95°C	3'	
Dénaturation des brins d'ADN	95°C	30''	} 43 cycles
Hybridation des amorces	55°C	20''	
Elongation	72°C	50''	
Elongation finale	72°C	8'	
Fin	4°C	∞	

L'action de la Rnase H 100U (10U / μ L) permet d'éliminer les éventuelles traces d'ARN avant l'étape de purification des échantillons ; réalisée à l'aide de billes magnétiques Agencourt® AMPure XP® (Beckman Coulter®). La qualité des amplicons obtenus est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%.

3.2.3. Préparation du « Master Pool »

L'ADN contenu dans les échantillons est quantifié avec le kit Quant-iT PicoGreen® (Invitrogen®) par fluorimétrie, sur l'automate LightCycler® 480II de Roche®, et est normalisé pour obtenir une concentration de 5×10^9 molécules d'ADN / μ L (afin de travailler en quantité équimolaire). Cela permet de s'affranchir de la charge virale initiale de l'échantillon et des rendements de PCR.

Un aliquot de chaque amplicon est transféré dans un seul et même tube. Le mélange ainsi constitué est appelé « Master Pool ». Le « Master Pool » est purifié deux fois grâce aux billes Agencourt® AMPure XP®, quantifié ; et dilué afin d'avoir une concentration finale de 2×10^6 molécules d'ADN / μ L.

3.3.PCR en émulsion – Clonage des fragments issus de la librairie

La PCR en émulsion est réalisée grâce à l'« emPCR Reagent (lib-A) V2 », l'« emPCR Kit Oil and Breaking Kit » et l'« emPCR Kit Bead Recovery Reagents ». Le volume d'amplicon à ajouter aux billes de capture est calculé afin d'obtenir un ratio de 2 molécules d'ADN par bille. Les conditions de réalisation de la PCR en émulsion sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Conditions de réalisation de la PCR en émulsion

Etapes	Température	Durée	
Dénaturation initiale	94°C	4'	
Dénaturation des brins d'ADN	94°C	30''	} 50 cycles
Hybridation des amorces	58°C	4'30''	
Elongation	68°C	30''	
Fin	10°C	∞	

Un enrichissement est ensuite réalisé sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine (« emPCR Kit Bead Recovery Reagents »), qui retiennent uniquement les billes recouvertes d'ADN et non les billes vides. Puis, en éluant avec une solution à base de NaOH (10N), on pourra séparer les billes d'enrichissement et ne garder que les billes chargées en ADN.

3.4. Réaction de séquençage : le pyroséquençage

Après amplification, les billes sont déposées sur une plaque PTP où va se réaliser la réaction de pyroséquençage (en présence des réactifs issus de « Sequencing Kit Packing Beads and Supplement CB », « Sequencing Kit Reagent and Enzymes » et « Sequencing Kit Buffer ») sur le 454-GS Junior[®] de Roche[®]. En accord avec les instructions du fabricant, deux cents cycles de séquençage sont réalisés durant une dizaine d'heures.

4. Acquisition des données concernant la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase et interprétation

4.1. Acquisition des données :

Les données ont été analysées selon la figure ci-dessous :

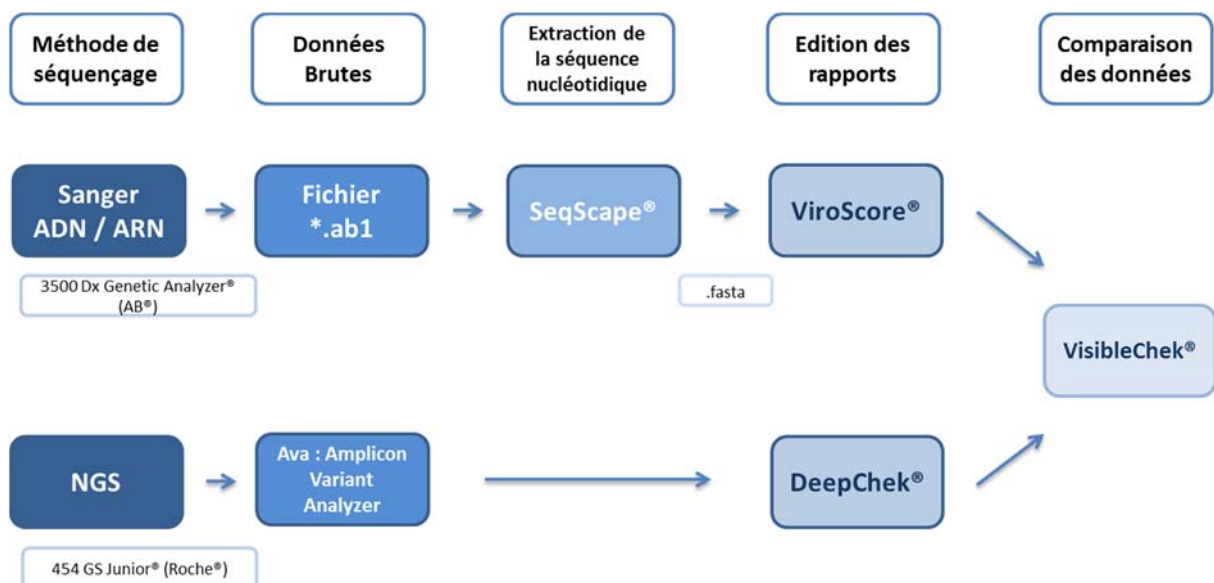


Figure 13 : Obtention des séquences et interprétation

Pour les séquences obtenues par méthode Sanger, les chromatogrammes natifs (fichiers *.ab1) sont lus par le logiciel SeqScape[®] (Thermo Fisher Scientific[®]) et, après vérification, alignés sur les séquences de référence auparavant incrémentées dans le logiciel. Les séquences sont ensuite exportées manuellement sous format fasta vers ViroScore[®].

Pour le séquençage NGS, les séquences consensus sont générées à partir de HIV Script et Ava (Amplicon Variant Analyzer) puis importées et analysées par DeepChek®.

Les systèmes ViroScore® et DeepChek® permettent une analyse complète des mutations de résistance sur les gènes de la protéase, de la rétro-transcriptase, et de l'intégrase selon un ou plusieurs algorithmes. Pour les séquences issues de la méthode Sanger, l'expertise se fait via ViroScore®, tandis que pour celles issues de la méthode NGS, l'expertise sera faite via DeepChek®. Enfin, grâce à VisibleChek®, on peut comparer, pour un même patient des séquences obtenues par des moyens différents (Sanger et NGS).

4.2. Identification des mutations et choix des seuils de détection

Pour identifier les mutations associées à une résistance aux antirétroviraux, nous nous sommes référés à la liste des mutations publiée par l'IAS en 2015 (92).

Pour l'interprétation des résultats, trois seuils ont été choisis pour la détection des mutations par séquençage de haut débit : 1%, 5% et 20%. Le seuil de 20 % a été retenu afin de comparer les résultats obtenus par séquençage haut débit à ceux obtenus par la méthode Sanger ; puisque le séquençage de population possède un seuil de détection des mutations aux alentours de 20% (15–17). Le seuil de 1% a été choisi pour l'analyse des mutations minoritaires. En effet, le taux d'erreur de séquençage étant nettement inférieur à 1% (85,106,107), chaque mutation présente à un taux supérieur ou égal à 1 % est donc significative (la mutation doit être présente à la fois sur le brin sens et sur le brin anti-sens). Le choix de 5 % est un bon compromis entre sensibilité de détection et couverture de séquençage.

Une mutation a été définie comme majeure si sa seule présence entraîne une résistance à un médicament antirétroviral. Une mutation est dite mineure si sa combinaison à une ou plusieurs autres mutations entraîne une apparition de résistance.

4.3. Interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux

L'interprétation de la sensibilité aux antiviraux a été effectuée avec l'aide des trois algorithmes suivants :

- ANRS v25 – 2015-09 (France),
- Stanford HIV database v7.0.1 – 2014-02-27 (Etats-Unis),
- Rega v9.1.0 – 2013-10-29 (Belgique).

Tous les principaux antirétroviraux approuvés par l'agence européenne des médicaments (EMA) et la Food and Drug Administration (FDA) ont été testés. Les virus ont été classés comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) aux antirétroviraux.

5. Analyse et interprétation du tropisme viral

Les séquences *.ab1 obtenues par le génotypage par méthode Sanger de la boucle V3 de la gp120 sont incrémentées pour vérification manuelle sur SeqScape puis exportées sous format fasta. Selon les recommandations de l'ANRS, le tropisme viral a été interprété avec l'utilisation de Geno2Pheno (FPR : 10%) pour les sous-types B et C et Géno2Pheno (FPR : 5%) pour les sous types CRF02-AG et D. Pour les autres sous-types, plusieurs méthodes ont été utilisées :

- Charge nette ≥ 6 .

La charge nette est calculée en faisant la soustraction entre les acides aminés de charge positive [lysine (K) et arginine (R)] et les acides aminés de charge négative [acide aspartique (D) et acide glutamique (E)].

- Présence de l'acide aminé R ou K en position 11 et/ou K en position 25 de la séquence nucléique.
- Présence de l'acide aminé R en position 25 et charge nette ≥ 5 .

Si une ou plusieurs de ces conditions est remplie, la population virale est prédite CXCR4. Si aucune n'est remplie, la population virale est majoritairement R5. Nous avons vérifié ces résultats grâce aux prédictions de l'algorithme PSSM (<https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>).

6. Analyse statistique

Les caractéristiques des patients sont représentées sous la forme de pourcentage ou de médiane et d'interquartiles. La concordance dans la détection des mutations entre le séquençage Sanger ADN / ARN et le séquençage ARN par NGS au seuil de 20% a été évaluée en utilisant le coefficient kappa (108). Les analyses et les graphes ont été réalisés grâce au logiciel Graphpad Prism v6® (La Jolla, CA, USA).

III. Résultats

1. Caractéristiques des patients

Des séquences complètes et de bonne qualité ont été obtenues par les trois techniques sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de l'intégrase pour 54 des 71 patients testés. Les résultats présentés dans ce travail ne concernent que les 54 patients avec des génotypes complets pour toutes les techniques. Les caractéristiques de ces 54 patients sont décrites dans le Tableau 12.

Les patients inclus dans ce travail sont principalement des hommes (87%) et ont un âge moyen de 38,5 ans. Le prélèvement étudié a été réalisé dans un délai moyen de 11 jours après la date de diagnostic de l'infection. Au moment du prélèvement, la charge virale médiane était de 4,93 log copies/mL, les taux médians de lymphocytes CD4+ et CD8+ étaient respectivement de 351 cellules /mL et de 771 cellules /mL soit un ratio CD4 /CD8 de 0,38.

Tableau 12 : Caractéristiques des patients

Caractéristiques des patients	Médiane (Interquartile)	Pourcentage (%)
Age (an)	38,5 (28,75 – 51)	
Sexe (% d'homme)		87
Temps écoulé depuis le diagnostic VIH+ (jours)	11 (7 – 17,50)	
Charge virale plasmatique VIH-1 (log10 copies/mL)	4,93 (4,38 – 5,40)	
Taux de CD4 (cellules/mL)	351 (173 – 543)	
Taux de CD8 (cellules/mL)	771 (578 – 1306)	
Ratio CD4/CD8	0,38 (0,20 – 0,65)	

2. Séquences et sous-types

En séquençage Sanger, une bonne qualité et une bonne couverture ont été observées pour l'ensemble des séquences des 54 patients analysés. Des codons stop ont été observés sur les séquences ADN VIH du gène de la protéase pour trois patients (008, 013 et 025) et du gène de la transcriptase inverse pour un patient (patient 050).

Pour le séquençage haut débit, un nombre suffisant de *reads* a été obtenu pour chaque amplicon. La longueur moyenne de chaque lecture (*read*) était de 375 pb et le nombre total de lectures varie de 77 000 à 100 000 par série de 10 échantillons. La profondeur de séquençage était de 14 000X.

La détermination du sous-type viral a été effectuée avec succès chez les 54 patients avec une concordance de 100% entre les trois méthodes de séquençage. La répartition des sous-types dans notre population d'étude est représentée sur la Figure 14. Les patients sont majoritairement infectés par le sous-type B avec un total de 38 patients (70,37%). La répartition des autres génotypes est la suivante : sous-type A (2 patients), sous-type F (3 patients), sous-type G (2 patients), recombinants A/G (6 patients), recombinants A/E (2 patients) et recombinant 11_cpx (1 patient).

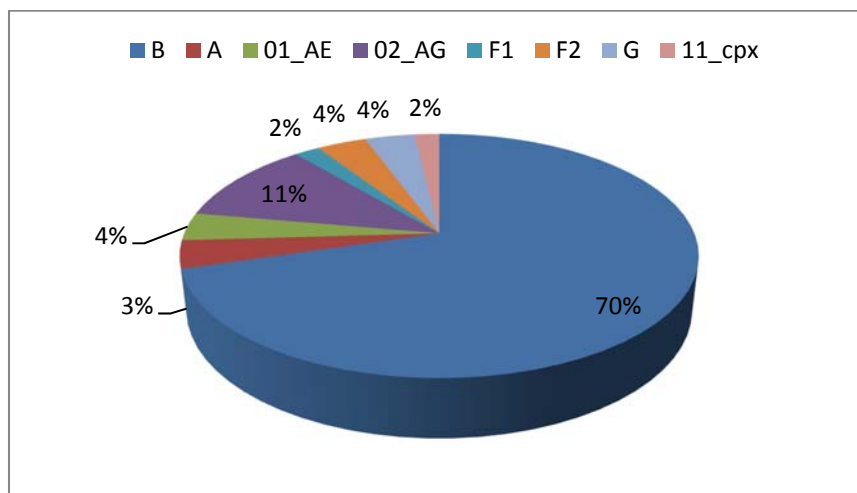


Figure 14 : Répartition des sous-types au sein de la population d'étude

3. Analyse des mutations de résistance

Selon les mutations décrites dans la liste IAS-USA 2015, le nombre total cumulé de mutations chez les 54 patients est de 222 par le séquençage Sanger sur ARN et de 225 sur ADN. En utilisant le séquençage à haut débit, le nombre de mutations est de 273, 416 et 559 respectivement avec un seuil de 20%, 5% et 1%. La prévalence de mutations la plus importante a été retrouvée pour le gène de la protéase mais il s'agit essentiellement de mutations mineures. Le nombre de patients ayant au moins une mutation majeure de résistance aux antirétroviraux est de 3, 5, 5, 10 et 20 en utilisant respectivement le séquençage Sanger sur ARN, sur ADN et le NGS au seuil de 20%, 5% et 1%. Ces résultats, ainsi que le détail par classe thérapeutique sont présentés dans les tableaux 13 et 14.

Tableau 13 : Nombre cumulatif de mutations associées à la résistance (IAS-USA 2015) chez l'ensemble des patients

Méthode de séquençage	INTI			INNTI			IP			II			Toutes classes		
	Majeure	Mineure	Total	Majeure	Mineure	Total	Majeure	Mineure	Total	Majeure	Mineure	Total	Majeure	Mineure	Total
Sanger ARN	1	0	1	2	5	7	0	211	211	0	3	3	3	219	222
Sanger ADN	2	0	2	4	7	11	2	209	211	0	1	1	8	217	225
NGS 20%	2	0	2	2	10	12	0	256	256	1	2	3	5	268	273
NGS 5%	8	0	8	3	18	21	3	378	381	1	5	6	15	401	416
NGS 1%	14	0	14	6	24	30	10	496	506	2	7	9	32	527	559

Tableau 14 : Prévalence des mutations majeures associées à la résistance (IAS-USA 2015) dans la population d'étude

Méthode de séquençage	Nombre de patients ayant au moins une mutation majeure de résistance aux				
	INTI	INNTI	IP	II	Total
Sanger ARN	1	2	0	0	3
Sanger ADN	2	3	1	0	5
NGS 20%	2	2	0	1	5
NGS 5%	6	3	3	1	10
NGS 1%	12	6	8	2	20

3.1. Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse (INTI)

Le nombre de patients ayant des mutations associées à une diminution de sensibilité du virus aux INTI est assez faible en séquençage Sanger sur ARN et sur ADN, ainsi qu'en NGS 20% (respectivement 1, 2 et 2 patients). Cependant, ce nombre augmente à 6 patients pour un seuil de NGS à 5% et à 12 patients pour un seuil à 1% (Tableau 14). Seule la mutation L210W a été retrouvée par toutes les techniques : chez un patient en séquençage Sanger ARN et en Sanger ADN, 2 en NGS 20%, 5 en NGS 5% et 6 en NGS 1%. La mutation M184I a été détectée dans la séquence ADN d'un patient (patient 050) qui comporte un codon stop mais cette mutation n'a pas été confirmée en ARN. Le séquençage de haut débit a permis la détection de mutations additionnelles telles que M41L, K65E, K70R, L74V et M184V. Ces données sont présentées dans la Figure 15.

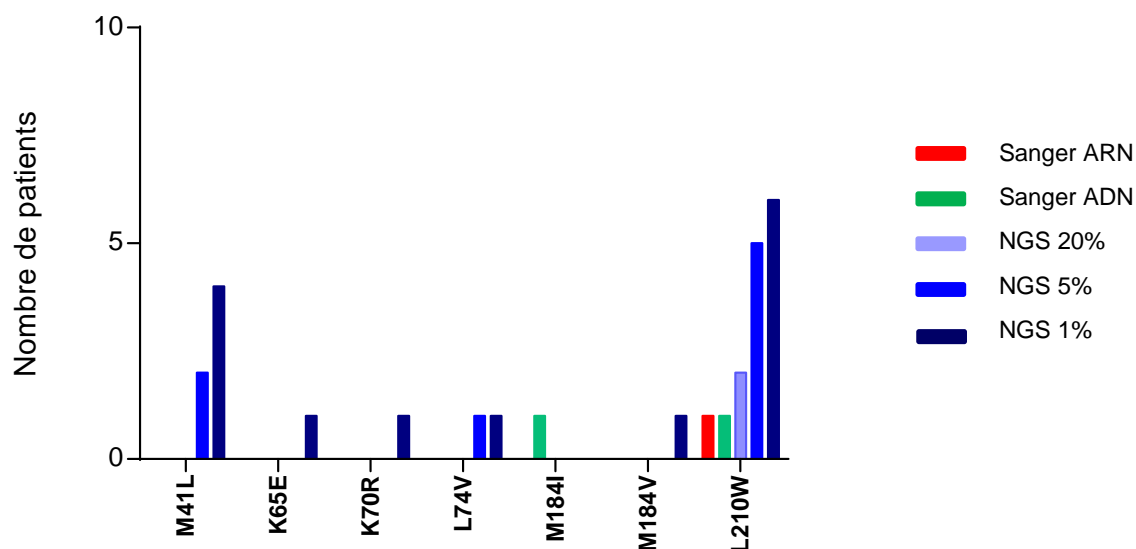


Figure 15 : Mutations associées à la résistance aux INTI (IAS-USA 2015)

Les mutations majeures sont présentées en gras

3.2. Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Des mutations majeures aux INNTI ont été retrouvées chez 2, 3, 2, 3 et 6 patients par séquençage Sanger ARN, Sanger ADN, NGS 20%, NGS 5% et NGS 1% respectivement (Tableau 14). D'après la Figure 16, la seule mutation majeure détectée par toutes les techniques est la mutation E138A (patient 064), d'autres mutations mineures, notamment V90I et V106I, ont également été retrouvées par toutes les techniques. La mutation A98G a été retrouvée chez 4 patients par NGS 20%, 12 patients par NGS 5% et 14 patients par NGS 1% alors qu'elle n'avait pas été observée sur les séquences Sanger. Les mutations E138K et M230I ont été retrouvées uniquement sur l'ADN, pour le même patient ayant la mutation M184I et le codon stop (patient 050).

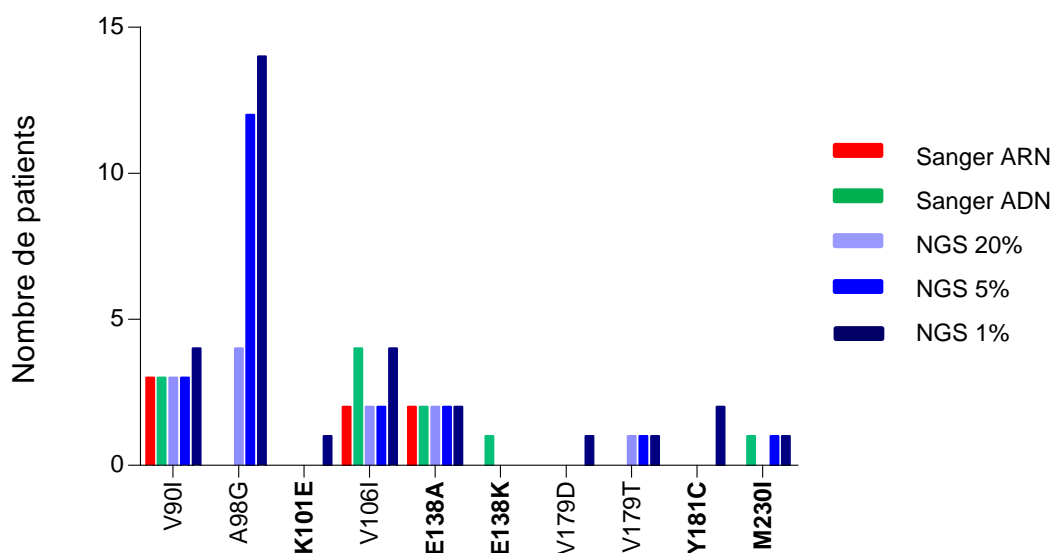


Figure 16 : Mutations associées à la résistance aux INNTI (IAS-USA 2015)

Les mutations majeures sont présentées en gras.

3.3. Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de la protéase

De très nombreuses mutations ont été retrouvées sur le gène de la protéase. Ce sont essentiellement des mutations mineures. Aucune mutation majeure n'a été observée par Sanger ARN ni par NGS 20%. Les mutations D30N et M46I, retrouvées lors du séquençage ADN (patient 013), sont situées sur une séquence contenant un codon stop. Le nombre de patients ayant une mutation majeure sur le gène codant pour la protéase augmente à 3 en NGS 5% et 8 en NGS 1% (Tableau 14). De nombreuses mutations mineures ont été détectées chez un très grand nombre de patients quelle que soit la méthode utilisée. Les mutations mineures ayant une prévalence de plus de 10% sont : L10I/V, G16E, K20I/R, M36I, D60E, I62V, L63P, I64V, H69K, A71T, V77I, L89M et I93L. Certaines mutations, peu fréquentes au sein de notre cohorte, n'ont été observées que par NGS 5% et NGS 1% : L10F, K20V, M46L, I47V, F53L, I54T, A71I et N88S. Ces données sont présentées dans la Figure 17.

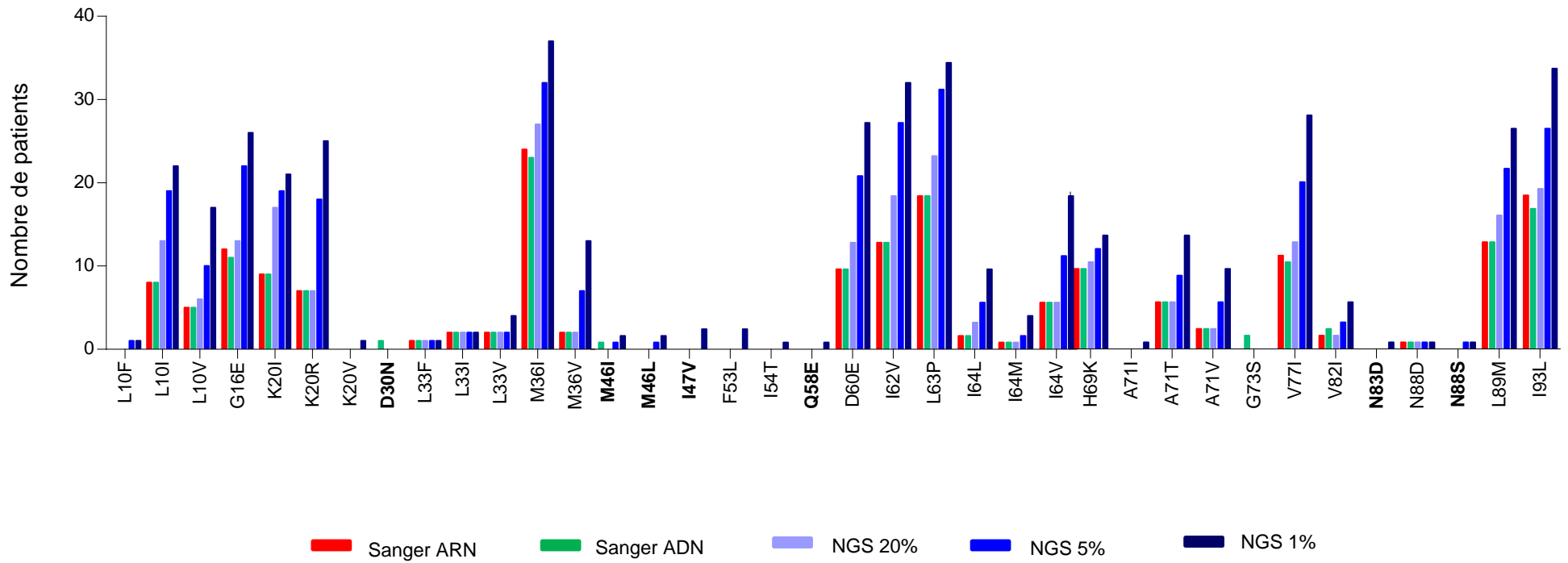


Figure 17 : Mutations associées à la résistance aux IP (IAS-USA 2015)

Les mutations majeures sont présentées en gras.

3.4. Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de l'intégrase

Peu de mutations sur le gène de l'intégrase ont été retrouvées. Aucune mutation majeure n'a été détectée par méthode Sanger. La mutation N155H, mutation majeure, a été retrouvée chez un patient en NGS 20% et en NGS 5%, ainsi que chez deux patients en NGS 1%. Deux mutations mineures (L74M et T97A) ont également été retrouvées chez un faible nombre de patients (0-5) selon la méthode de séquençage utilisée.

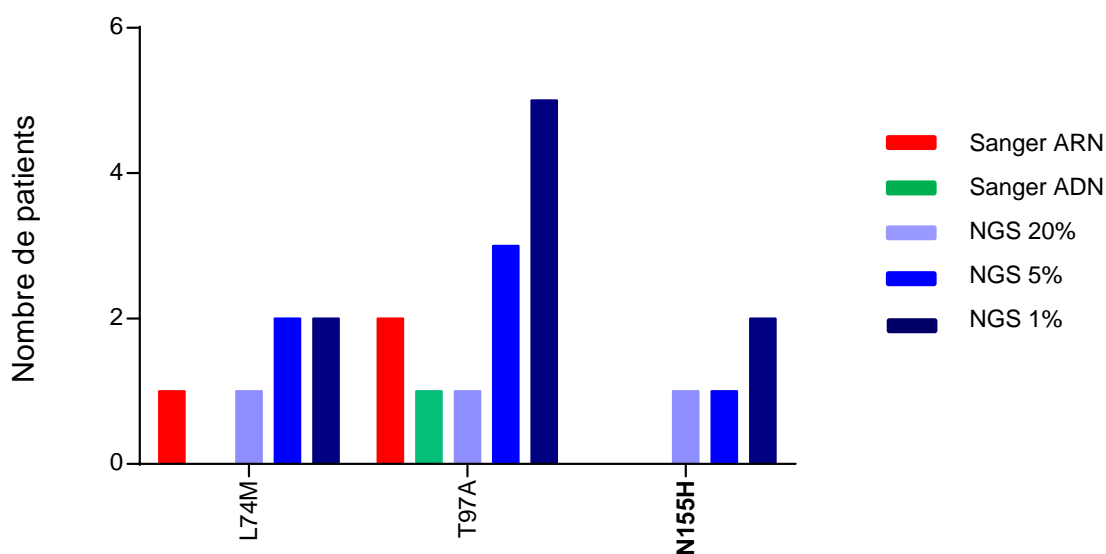


Figure 18 : Mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'intégrase (IAS-USA 2015)

Les mutations majeures sont présentées en gras.

3.5.Corrélation des mutations détectées par séquençage Sanger sur ARN et sur ADN et du séquençage haut débit au seuil de 20%

Nous avons étudié la concordance pour la détection de mutations de résistance entre le séquençage Sanger sur ARN (technique de référence) et le séquençage Sanger sur ADN. Etant donné qu'il est habituellement admis que le séquençage Sanger ne détecte que les variants avec une prévalence d'environ 20% (15–17), nous avons également comparé la détection des mutations par le NGS au seuil de 20% à celle de la méthode de Sanger sur ARN. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Quelle que soit la classe médicamenteuse, on obtient une excellente concordance entre les différentes techniques (> 98%). Cette concordance doit être néanmoins modérée par le faible nombre de mutations présentes, comme le montre pour certaines classes le coefficient kappa obtenu. Les principales discordances entre les séquençages Sanger sur ADN et sur ARN sont dues à la présence de mutations supplémentaires détectées dans les séquences ADN contenant des codons stop. Le séquençage de haut débit, au seuil de détection de 20%, apparaît plus sensible que le séquençage Sanger sur ARN en permettant la détection de mutations supplémentaires, plus particulièrement dans la détection de mutations mineures sur le gène de la protéase. Cette méthode a aussi permis la détection de la mutation N155H conférant une résistance aux inhibiteurs de l'intégrase.

Tableau 15 : Concordance entre Sanger ARN, Sanger ADN et NGS 20%

Classe thérapeutique	Méthode de séquençage et présence ou non de mutation de résistance		Sanger ARN		Concordance (%)	Coefficient Kappa	Mutations à l'origine des discordances
			Présence (n)	Absence (n)			
INTI	Sanger ADN	Présence (n)	1	1	99.88	0.67	M184I
		Absence (n)	0	862			
	NGS 20%	Présence (n)	1	1	99.98	0.67	
		Absence (n)	0	862			
INNTI	Sanger ADN	Présence (n)	7	4	99.78	0.78	E138K, M230I, V106I
		Absence (n)	0	1825			
	NGS 20%	Présence (n)	7	5	99.73	0.74	
		Absence (n)	0	1824			
IP	Sanger ADN	Présence (n)	211	5	99.75	0.98	D30N, M46I, G16E, M36I, G73S, V77I, V82I, I93L
		Absence (n)	5	3780			
	NGS 20%	Présence (n)	209	45	98.87	0.90	
		Absence (n)	0	3742			
II	Sanger ADN	Présence (n)	1	0	99.82	0.5	L74M, T79A
		Absence (n)	2	1131			
	NGS 20%	Présence (n)	2	1	99.82	0.67	
		Absence (n)	1	1130			

Le calcul de la concordance est basé sur le nombre de mutations contenues dans la liste de l'IAS-USA 2015 (16, 34, 74 et 21 respectivement pour les INTI, INNTI, IP et II) et le nombre de patients (54) soit un total de 864 mutations pour les INTI, 1836 pour les INNTI, 3996 pour les IP et 1134 pour les II.

4. Interprétation de la résistance aux antirétroviraux selon différents algorithmes

Afin d'étudier l'impact des mutations présentes sur la réponse au traitement antirétroviral, la sensibilité du virus aux principales molécules actives sur le VIH-1 a été déterminée par trois principaux algorithmes : ANRS, Stanford et Rega. Ces données sont disponibles dans les tableaux 16 à 21.

De façon générale, l'analyse du profil de sensibilité de l'ensemble des séquences aux antirétroviraux montre une prévalence élevée de sensibilité (>95%) en séquençage Sanger ARN et ADN ainsi qu'en NGS 20%, quel que soit l'algorithme utilisé. La sensibilité aux antirétroviraux diminue lorsque le seuil de détection des mutations est abaissé à 5% et à 1%. Ainsi, au seuil de 1%, la proportion de séquences sensibles n'est plus que de 86,6%, 85,5% et 90,3% avec ANRS, Stanford et Rega respectivement. Même si les données globales sont assez homogènes, des différences entre les classes thérapeutiques peuvent être observées dans le Tableau 16. Par ailleurs, il y a des discordances entre les algorithmes, parfois au sein d'une même classe thérapeutique. Ainsi, parmi les antirétroviraux, les différences selon les algorithmes sont plus importantes pour l'abacavir, la didanosine, le ténofovir, l'étravirine, la névirapine et la rilpivirine, plus spécialement pour le NGS au seuil de 1% (Tableaux 18 et 19). Ces observations sont également visibles dans le tableau 17 qui récapitule le nombre de patients résistant ou intermédiaire à au moins une molécule thérapeutique en fonction des techniques utilisées et des classes thérapeutiques.

Tableau 16 : Interprétation de la résistance aux antirétroviraux selon trois algorithmes

Algorithme	Méthode de séquençage	INTI			INNTI			IP			II			Tous antirétroviraux		
		S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
ANRS	Sanger ARN	98.1	0.3	1.6	97.7	1.4	0.9	93.1	4.8	2.1	100	0	0	97.2	1.6	1.2
	Sanger ADN	97.4	0.5	2.1	95.8	1.9	2.3	92.2	5.3	2.5	100	0	0	96.4	1.9	1.7
	NGS 20%	97.4	0.5	2.1	97.7	1.4	0.9	89.1	7.7	3.2	98.6	0	1.4	95.7	2.4	1.9
	NGS 5%	93.4	1.1	5.5	96.3	2.3	1.4	79.6	8.4	12.0	98.6	0	1.4	91.9	3.0	5.1
	NGS 1%	86.2	2.4	11.4	88.0	5.1	6.9	75.2	6.5	18.3	97.2	0	2.8	86.6	3.5	9.9
STANFORD	Sanger ARN	97.6	2.4	0	99.1	0.9	0	97.6	2.1	0.3	95.7	3.1	1.2	97.5	2.1	0.4
	Sanger ADN	96.9	2.6	0.5	97.2	2.3	0.5	97.4	2.3	0.3	97.5	2.5	0	97.3	2.4	0.3
	NGS 20%	96.3	3.7	0	95.8	4.0	0	99.5	0.5	0	96.9	1.9	1.2	97.2	2.5	0.3
	NGS 5%	90.5	8.5	1.0	85.2	13.9	0.9	96.1	3.4	0.5	95.1	3.7	1.2	91.7	7.4	0.9
	NGS 1%	80.2	17.7	2.1	79.2	18.5	2.3	92.6	6.9	0.5	90.1	7.4	2.5	85.5	12.6	1.9
REGA	Sanger ARN	98.1	1.6	0.3	98.1	1.9	0	98.2	1.3	0.5	97.6	1.2	1.2	98.0	1.5	0.5
	Sanger ADN	97.4	1.6	1.0	97.2	1.4	1.4	98.9	0.8	0.3	100	0	0	98.4	1.0	0.7
	NGS 20%	97.4	2.1	0.5	98.6	1.4	0	99.2	0.8	0	98.2	0.6	1.2	98.4	1.2	0.4
	NGS 5%	94.2	5.3	0.5	93.5	5.6	0.9	95.3	4.2	0.5	97.6	1.2	1.2	95.2	4.0	0.8
	NGS 1%	87.8	10.3	1.9	88.4	8.3	3.3	89.4	9.5	1.1	95.7	1.8	2.5	90.3	7.5	2.2

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant. Le calcul des pourcentages est basé sur le nombre de molécules analysées [7, 4, 8/7 et 4/3 (ANRS / Rega et Standford)] respectivement pour les INTI, INNTI, IP, II et le nombre de patients (54).

Tableau 17 : Patients intermédiaire ou résistant à au moins un médicament antirétroviral, selon trois algorithmes d'interprétation

Algorithme	Méthode de séquençage	Nombre de patients intermédiaire ou résistant à au moins un médicament antirétroviral (total = 54)			
		INTI	INNTI	IP	II
ANRS	Sanger ARN	3	3	21	0
	Sanger ADN	4	4	22	0
	NGS 20%	4	3	31	1
	NGS 5%	9	6	39	1
	NGS 1%	19	14	46	2
STANFORD	Sanger ARN	3	2	3	5
	Sanger ADN	4	3	4	4
	NGS 20%	4	6	2	4
	NGS 5%	11	15	5	6
	NGS 1%	20	18	12	10
REGA	Sanger ARN	4	3	2	2
	Sanger ADN	6	3	2	0
	NGS 20%	6	3	2	2
	NGS 5%	11	7	13	3
	NGS 1%	21	11	25	5

4.1. Résistance aux inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse (INTI)

Globalement, les interprétations de résistance sont assez homogènes quel que soit l'algorithme utilisé pour un seuil d'interprétation d'environ 20% en Sanger ARN/ADN et en NGS 20%. La prévalence de séquences sensibles varie de 96,3% à 98,1% (Tableau 16). Cependant, lorsque le seuil de détection des mutations est abaissé à 5% et 1%, les prédictions de Stanford apparaissent plus strictes que les autres outils. Ainsi, la prévalence moyenne de sensibilité pour les INTI et les INNTI est d'environ 87% pour ANRS et Rega alors qu'elle n'est que de 80% pour Stanford (données correspondant au NGS 1%) (Tableau 16). Néanmoins, pour une même technique de séquençage, le nombre de patients résistant ou intermédiaire à au moins un INTI est assez homogène quel que soit l'algorithme utilisé (de 3-4 patients en Sanger ARN à 19-21 en NGS 1%) (Tableau 17).

L'analyse détaillée pour chaque molécule décrite dans le Tableau 18 montre que les résultats pour l'emtricitabine et la lamivudine sont superposables quelles que soient la technique et la méthode d'analyse utilisées. De même pour la stavudine et la zidovudine, excepté une discordance mineure observée en NGS 1% par Rega. La sensibilité au tenofovir est bien conservée avec ANRS et Rega, alors qu'elle est significativement impactée lorsque l'on utilise Stanford, surtout en NGS 1%. Cela est aussi le cas pour la sensibilité de la didanosine. L'abacavir est assez bien sauvegardé par Rega alors qu'on observe des diminutions de sensibilité significatives par ANRS et Stanford, surtout lorsque l'on utilise le NGS à des seuils de sensibilité bas (5% et 1%). Toutes méthodes de séquençage et d'interprétation confondues, les molécules les plus épargnées par les résistances sont l'emtricitabine et la lamivudine, alors que les plus touchées sont la stavudine et la zidovudine.

Tableau 18 : Résistance aux inhibiteurs nucléosi(ti)diques de la transcriptase inverse

Algorithme	Méthode de séquençage	Nombre de patients (total = 54)																				
		ABC			DDI			FTC			3TC			d4T			TDF			ZDV		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ANRS	Sanger ARN	53	1	0	54	0	0	54	0	0	54	0	0	51	0	3	54	0	0	51	0	3
	Sanger ADN	52	2	0	54	0	0	53	0	1	53	0	1	51	0	3	54	0	0	51	0	3
	NGS 20%	52	2	0	54	0	0	54	0	0	54	0	0	50	0	4	54	0	0	50	0	4
	NGS 5%	49	4	1	53	0	1	54	0	0	54	0	0	45	0	9	53	0	1	45	0	9
	NGS 1%	44	9	1	52	0	2	53	0	1	53	0	1	36	0	18	52	0	2	36	0	18
STANFORD	Sanger ARN	53	1	0	53	1	0	54	0	0	54	0	0	51	3	0	53	1	0	51	3	0
	Sanger ADN	52	2	0	53	1	0	53	0	1	53	0	1	51	3	0	53	1	0	51	3	0
	NGS 20%	52	2	0	52	2	0	54	0	0	54	0	0	50	4	0	52	2	0	50	4	0
	NGS 5%	49	4	1	49	4	1	54	0	0	54	0	0	43	10	1	50	4	0	43	10	1
	NGS 1%	42	11	1	41	12	1	53	0	1	53	0	1	35	17	2	44	10	0	35	17	2
REGA	Sanger ARN	54	0	0	53	0	1	54	0	0	54	0	0	51	3	0	54	0	0	51	3	0
	Sanger ADN	54	0	0	52	0	2	53	0	1	53	0	1	51	3	0	54	0	0	51	3	0
	NGS 20%	54	0	0	52	0	2	54	0	0	54	0	0	50	4	0	54	0	0	50	4	0
	NGS 5%	53	1	0	51	1	2	54	0	0	54	0	0	45	9	0	54	0	0	45	9	0
	NGS 1%	52	2	0	49	2	3	53	0	1	53	0	1	36	17	1	54	0	0	35	18	1

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant

ABC : Abacavir, DDI : Didanosine, FTC : Emtricitabine, 3TC : Lamivudine, d4T : Stavudine, TDF : Ténofovir, ZDV : Zidovudine.

4.2. Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

De façon similaire aux INTI, les interprétations de résistance pour les INNTI sont assez homogènes quel que soit l'algorithme utilisé, pour un seuil d'interprétation d'environ 20% (Sanger ARN/ADN et NGS 20%). D'après le Tableau 17, Stanford apparait comme l'outil le moins favorable surtout aux seuils de 5% et de 1%. En effet, selon la méthode de séquençage utilisée, le nombre de patients intermédiaire ou résistant à au moins un INNTI varie de 2 à 18 avec Stanford, de 3 à 14 avec ANRS et de 3 à 11 avec Rega.

Tableau 19 : Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

Algorithme	Méthode de séquençage	Nombre de patients (total = 54)											
		EFV			ETR			NVP			RPV		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ANRS	Sanger ARN	54	0	0	51	3	0	54	0	0	52	0	2
	Sanger ADN	53	0	1	50	3	1	53	1	0	51	0	3
	NGS 20%	54	0	0	51	3	0	54	0	0	52	0	2
	NGS 5%	54	0	0	49	5	0	54	0	0	51	0	3
	NGS 1%	51	0	3	41	10	3	51	0	3	47	1	6
STANFORD	Sanger ARN	54	0	0	54	0	0	54	0	0	52	2	0
	Sanger ADN	53	1	0	53	1	0	53	1	0	51	2	1
	NGS 20%	54	0	0	53	1	0	51	3	0	49	5	0
	NGS 5%	51	3	0	51	3	0	42	10	2	40	14	0
	NGS 1%	47	7	0	48	6	0	39	10	5	37	17	0
REGA	Sanger ARN	53	1	0	54	0	0	53	1	0	52	2	0
	Sanger ADN	53	0	1	53	1	0	53	0	1	51	2	1
	NGS 20%	54	0	0	53	1	0	54	0	0	52	2	0
	NGS 5%	50	3	1	52	2	0	50	3	1	50	4	0
	NGS 1%	47	4	3	50	4	0	47	3	4	47	7	0

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant
 EFV : Efavirenz, ETR : Etravirine, NVP : Névirapine, RPV : Rilpivirine

La sensibilité à la névirapine et à la rilpivirine est significativement impactée avec Standford pour les méthodes NGS 20%, 5% et 1%, de même que celle de l'étravirine avec ANRS en NGS 1% (Tableau 19).

4.3.Résistance aux inhibiteurs de la protéase

Pour les inhibiteurs de la protéase, ANRS apparaît clairement comme l'outil le plus strict. La prévalence de séquences sensibles varie de 93,1% à 75,2% pour l'ANRS, de 99,5% à 92,6% pour Standford et de 99,2% à 89,4% pour Rega (Tableau 16). De plus, le nombre de patients étant intermédiaire ou résistant à au moins une molécule de cette classe, est nettement plus élevé avec ANRS (21-46) qu'avec Standford (2-12) et Rega (2-25) (Tableau 17). Le détail pour chaque molécule montre que l'atazanavir et le saquinavir sont fortement touchés avec ANRS quel que soit le seuil de détection des mutations. De plus, la proportion de séquences sensibles est plus faible en NGS 20% qu'en Sanger (les données issues du Sanger ADN et ARN sont presque superposables). Le lopinavir est aussi plus atteint avec ANRS qu'avec les autres algorithmes mais uniquement lorsque le seuil de détection des mutations est abaissé à 5% ou à 1%. Concernant le nelfinavir, il est plus affecté par les prédictions de Standford et de Rega (NGS 5% et NGS 1% uniquement). Le darunavir boosté par le ritonavir apparaît comme la molécule la plus robuste puisqu'aucune résistance n'a été retrouvée quels que soient la méthode et l'algorithme utilisés. Ces données sont présentées dans le tableau 20.

Tableau 20 : Résistance aux inhibiteurs de la protéase

Algorithmme	Méthode de séquençage	Nombre de patients (total = 54)																							
		ATV/RTV			DRV/RTV (*)			DRV/RTV 800/100 QD			FPV/RTV			IDV			LPV/RTV			NFV			SQV/RTV		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ANRS	Sanger ARN	40	11	3	54	0	0	54	0	0	54	0	0	54	0	0	53	1	0	53	0	1	40	9	5
	Sanger ADN	40	11	3	54	0	0	54	0	0	54	0	0	53	0	1	52	2	0	52	0	2	39	10	5
	NGS 20%	34	17	3	54	0	0	54	0	0	53	0	1	54	0	0	52	2	0	53	0	1	31	14	9
	NGS 5%	22	13	19	54	0	0	54	0	0	53	0	1	52	0	2	36	12	6	52	0	2	21	11	22
	NGS 1%	19	9	26	54	0	0	54	0	0	53	0	1	50	0	4	29	9	16	52	0	2	14	10	30
STANFORD	Sanger ARN	54	0	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	54	0	0	54	0	0	52	2	0	54	0	0
	Sanger ADN	53	1	0	54	0	0	NA	NA	NA	53	1	0	53	1	0	53	1	0	51	2	1	51	3	0
	NGS 20%	54	0	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	54	0	0	54	0	0	52	2	0	54	0	0
	NGS 5%	52	1	1	54	0	0	NA	NA	NA	52	2	0	51	3	0	53	1	0	49	4	1	52	2	0
	NGS 1%	52	1	1	54	0	0	NA	NA	NA	51	3	0	49	5	0	50	4	0	44	9	1	50	4	0
REGA	Sanger ARN	53	1	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	53	0	1	53	1	0	52	1	1	52	2	0
	Sanger ADN	54	0	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	53	1	0	54	0	0	52	1	1	53	1	0
	NGS 20%	54	0	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	54	0	0	54	0	0	52	2	0	53	1	0
	NGS 5%	53	1	0	54	0	0	NA	NA	NA	54	0	0	52	1	1	53	1	0	43	10	1	51	3	0
	NGS 1%	53	0	1	54	0	0	NA	NA	NA	53	1	0	50	2	2	51	3	0	31	22	1	46	8	0

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant, NA : non applicable

ATV : Atazanvir, RTV : Ritonavir, DRV : Darunavir, FPV : Fosamprénavir, IDV : Indinavir, LPV : Lopinavir, NFV : Nelfinavir, SQV : Saquinavir

(*) correspond à l'association DRV/RTV 600/100 BID pour ANRS et à DRV/RTV pour les algorithmes Standford et Rega

4.4. Résistance aux inhibiteurs de l'intégrase

La plupart des séquences sont sensibles aux inhibiteurs de l'intégrase. Stanford apparait comme l'outil d'interprétation le moins favorable. En effet, la proportion de séquences sensibles varie de 97,5% à 90,1% pour Stanford alors qu'elle est de 100% à 97,2% pour ANRS et de 100% à 95,7% pour Rega (Sanger ARN à NGS 1%). De plus, le nombre de patients intermédiaire ou résistant à au moins un inhibiteur d'intégrase est plus élevé pour Stanford (4-10) que pour Rega (0-5) et pour l'ANRS (0-2) (Tableau 17).

Tableau 21 : Résistance aux inhibiteurs de l'intégrase

Algorithme	Méthode de séquençage	Nombre de patients (total = 54)											
		DTG			DTG (*)			EVG			RAL		
		50mg BID											
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ANRS	Sanger ARN	54	0	0	54	0	0	54	0	0	54	0	0
	Sanger ADN	54	0	0	54	0	0	54	0	0	54	0	0
	NGS 20%	54	0	0	53	0	1	53	0	1	53	0	1
	NGS 5%	54	0	0	53	0	1	53	0	1	53	0	1
	NGS 1%	54	0	0	52	0	2	52	0	2	52	0	2
STANFORD	Sanger ARN	NA	NA	NA	53	1	0	53	0	1	49	4	1
	Sanger ADN	NA	NA	NA	54	0	0	54	0	0	50	4	0
	NGS 20%	NA	NA	NA	54	0	0	53	0	1	50	3	0
	NGS 5%	NA	NA	NA	54	0	0	52	1	1	48	5	1
	NGS 1%	NA	NA	NA	53	1	0	49	3	2	44	8	2
REGA	Sanger ARN	NA	NA	NA	53	1	0	53	0	1	52	1	1
	Sanger ADN	NA	NA	NA	54	0	0	54	0	0	54	0	0
	NGS 20%	NA	NA	NA	54	0	0	53	0	1	52	1	1
	NGS 5%	NA	NA	NA	54	0	0	53	0	1	51	2	1
	NGS 1%	NA	NA	NA	54	0	0	51	1	2	50	2	2

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant, NA : non applicable

DTG : Dolutégravir, EVG : Elvitégravir, RAL : Raltégravir

(*) correspond à l'association DTG 50mg QD pour ANRS et à l'utilisation du dolutégravir seul (DTG) pour l'utilisation des algorithmes Stanford et Rega

L'interprétation de chaque molécule est détaillée dans le Tableau 21. Les résultats sont assez comparables, pour une même méthode de séquençage, d'un outil d'interprétation à l'autre. Cependant, on note une diminution de la sensibilité pour le raltégravir avec Standford. Toutes les séquences testées ont été retrouvées sensibles pour le dolutégravir en prise bi-quotidienne (DTG 50 mg BID) ; cette interprétation n'est disponible qu'avec ANRS.

5. Tropisme viral

Le séquençage de la région V3 de la gp120, permettant de déterminer le tropisme viral, a été réalisé uniquement par méthode Sanger. Des séquences ont été obtenues pour 50 des 54 patients. La répartition des souches, selon leur tropisme et la matrice utilisée pour le séquençage, est présentée dans la Figure 19. Ainsi, des virus à tropisme X4 ont été retrouvés chez 18% (9/50) dans l'ARN plasmatisque et 22,2% (12/50) dans l'ADN.

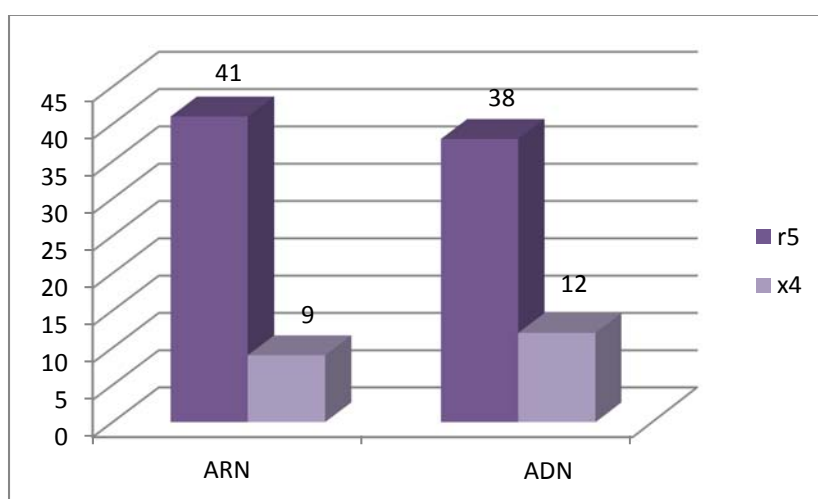


Figure 19 : Tropisme viral en fonction de la matrice utilisée

Nous avons observé une très bonne concordance (94%) pour le tropisme entre les deux compartiments et un kappa de 0,820. Trois discordances ont été retrouvées (patients 003, 010 et 046). Toutes les discordances ARN/ADN ont été observées dans le même sens, c'est-à-dire, une population déterminée R5 sur l'ARN et X4 sur l'ADN, et sur des virus de sous-type B. Les FPR obtenus avec l'algorithme Geno2Pheno pour ces trois séquences (003, 010 et 046) étaient respectivement de 21,2%, 27,2% et 22,8% sur l'ARN et de 7,1%, 7,9% et 9% sur l'ADN.

6. Impact des variants minoritaires sur l'issue du traitement antirétroviral

Un traitement antirétroviral a été instauré chez tous les patients dans un délai moyen de 27 jours (IC : 11-58 jours) selon les résultats du génotypage réalisé en routine par méthode Sanger sur ARN plasmatique. La première ligne de traitement était composée de 2 INTI + 1 IP chez 61,2% des patients, 2 INTI + 1 II chez 24% et de 2 INTI + 1 INNTI chez 14,8% d'entre eux. Les données de suivi à six mois post-traitement pour cinquante patients ont été récupérées. Seulement sept d'entre eux n'ont pas obtenu de négativation de la charge virale à six mois, ce qui correspond à la définition d'un échec virologique. Cependant, leurs charges virales plasmatiques restent très basses (médiane : 86 copies/mL, IC : 59-330 copies/mL). Nous avons analysé le profil de résistance obtenu par méthode NGS au seuil de 1% pour ces sept patients afin de rechercher la présence éventuelle de mutations minoritaires pouvant expliquer cet échec. Aucune mutation impactant le traitement pris par chacun des patients n'a été retrouvée. L'historique des traitements et le profil de résistance (NGS 1%) pour chacun de ces patients sont détaillés dans le tableau 22. Un an après le début du traitement, cinq patients avaient toujours une charge virale plasmatique détectable.

Tableau 22 : Profil initial de résistance des patients n'ayant pas négativé leur charge virale après six mois de traitement

Patients	Taux de CD4 (cellules/mm ³)		Charge virale (log copies/mL)		Traitement	Résistance lors du génotypage initial en utilisant la méthode NGS au seuil de 1% et l'algorithme de l'ANRS					
	T0	T + 6m	T0	T + 6m		Transcriptase inverse		Protéase		Intégrase	
						Mutations	Molécules R/I	Mutations	Molécules R/I	Mutations	Molécules R/I
F1	305	615	4.8	2.5	ABC+FTC+DRV/r pendant 45 jours et ABC+3TC+DRV/r	-	-	Liste 1	ATV, SQV	-	-
F2	49	376	6.1	1.8	ABC+3TC+DRV/r pendant 2 jours; ABC+3TC+LPV/r pendant 10 mois et ABC+3TC+RAL	-	-	Liste 2	-	-	-
F3	63	228	5.5	2	TDF+FTC+DRV/r pendant 8 mois et TDF+FTC+DTG	-	-	Liste 3	ATV, SQV, LPV	-	-
F4	114	225	6.1	5.6	TDF+FTC+LPV/r pendant 6 jours et TDF+FTC+DRV/r	-	-	Liste 4	ATV, SQV	-	-
F5	629	960	5.5	1.4	TDF+FTC+DRV/r pendant 6 mois et TDF+FTC+RPV	-	-	Liste 5	ATV	-	-
F6	34	140	6	1.9	TDF+FTC+DRV/r	-	-	Liste 6	ATV, SQV	-	-
F7	474	1044	7	1.9	TDF+FTC+DRV/r	V179D	RPV	Liste 7	ATV, SQV, LPV	N155H	RAL, EVG, DTG

Liste 1: L10I/V, G16E, M36I, I47V, D60E, I62V, L63P, I64L, V77I, L89M, I93L

Liste 2: K20I, M36I, L63P, H69K, V82I, L89M

Liste 3: K20R, M36I, D60E, I62V, L63P, I64L/M/V, A71T, V77I, L89M

Liste 4: L10V, G16E, K20I, M36I, I64M, H69K, L89M, I93L

Liste 5: L33I, D60E, I64V

Liste 6: G16E, D60E, I62V, A71T, I93L

Liste 7: L10I/V, G16E, K20I/R, M36I/V, F53L, D60E, I62V, L63P, I64M, H69K, A71T, V77I, V82I, L89M/V

IV. Discussion

1. Résistance aux antirétroviraux chez les patients naïfs

La prévalence de la résistance aux antirétroviraux, lors du génotypage initial par séquençage de l'ARN viral plasmatique par méthode Sanger, est variable selon les pays mais elle est relativement stable en Europe, environ 10% (109). Les mutations à l'origine de résistance chez des patients naïfs peuvent être, soit acquises directement par l'infection avec un virus résistant, soit sélectionnées *in vivo* grâce aux différents mécanismes de variabilité génétique. Nous avons utilisé la liste de mutations IAS-USA développée pour une utilisation clinique, basée sur des approches expérimentales et des données de sensibilité des isolats cliniques (92). Cette liste est différente de celle de l'OMS destinée à la surveillance épidémiologique de la résistance (110). En séquençage Sanger ARN, et en utilisant la liste IAS-USA, la proportion de patients infectés par un virus présentant au moins une mutation majeure de résistance est de 1,85% pour les INTI et de 3,70% pour les INNTI. Il n'y a pas de mutation majeure pour les IP et les II. L'analyse des profils de sensibilité aux antirétroviraux avec l'algorithme d'interprétation de l'ANRS, qui est utilisé en routine, a retrouvé une proportion de patients infectés par un virus résistant ou intermédiaire à au moins une molécule était de 5,6%, 5,6% et 38,9% respectivement dans la classe des INTI, INNTI et IP. Il n'y avait aucune résistance aux II.

En France, l'enquête de prévalence utilisant la liste OMS, avait retrouvé en 2012, une fréquence de portage de virus ayant au moins une mutation de résistance, estimée à 11,7% (IC 95% = 10-13,5%) avec 5,2% de virus résistants aux INTI, 7,1% aux INNTI, 2,5% aux IP et 1,5% aux II (111). Les virus résistants respectivement à une, deux, ou trois classes thérapeutiques étaient de 9,6%, 1% et 1,1% (111).

Selon les données de la littérature, la prévalence des échecs virologiques après une première ligne de traitement est d'environ 4% chez les patients n'ayant pas de résistance initiale ; alors qu'elle est de 15% chez les patients ayant une résistance mais recevant une thérapie pleinement efficace (4). Une partie de cet échec peut résulter de l'absence de détection de mutations préexistantes par le séquençage de population. Cela met en évidence l'intérêt d'une méthode de détection plus sensible ; mais cliniquement pertinente pour la pratique courante.

2. Pertinence des données de la technique Sanger sur ADN

2.1. Mutations de résistance sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de l'intégrase

Une très bonne concordance (>99%) a été retrouvée pour la détection des mutations sur l'ARN et sur l'ADN par séquençage Sanger. Cependant, nos données suggèrent que le séquençage sur l'ADN proviral n'améliore pas réellement la détection des mutations chez les patients naïfs. En effet, même si toutes les mutations majeures détectées par séquençage Sanger sur l'ARN plasmatique ont été retrouvées sur l'ADN proviral, le séquençage de l'ADN-VIH peut manquer de sensibilité. Par exemple, la mutation L74M n'a pas été retrouvée sur l'ADN, alors qu'elle était présente sur l'ARN à la fois en Sanger, et sur 27.8% des séquences détectées par le séquençage haut débit. Le séquençage de l'ADN peut aussi manquer de spécificité. En effet, nous avons détecté trois mutations supplémentaires pouvant entraîner une résistance aux INNTI (V106I, E138K et M230I), une aux INTI (M184I) et deux aux IP (D30N et M46I). L'absence de ces mutations sur l'ARN plasmatique est objectivée par le séquençage haut débit ; puisqu'on ne retrouve pas ces mutations, même au seuil de 1%. Certains auteurs ont retrouvé une grande concordance dans la détection des mutations de résistance par méthode Sanger sur l'ARN plasmatique et sur l'ADN proviral, que ce soit chez des patients naïfs (8–10) ou chez des patients en échec virologique (112,113). D'autres, par contre, ont rapporté une faible concordance entre les séquences obtenues par ces deux méthodes (114,115). De même, la pertinence clinique du séquençage sur ADN par rapport à l'ARN semble limitée. En effet, il a été démontré qu'en cas d'échec virologique avec une virémie faible, l'analyse cumulée des génotypages Sanger antérieurs sur ARN est plus informative que le séquençage de l'ADN contenu dans les cellules mononuclées pour l'analyse des mutations de résistance (114).

Plusieurs notions expliquent la présence de mutations supplémentaires sur l'ADN-VIH. D'une part, le séquençage de l'ADN proviral est le reflet du réservoir viral. Il permet donc de séquencer le génome viral dans un grand nombre de cellules infectées, à la fois des cellules activées et des cellules latentes. Chez les patients naïfs, les mutants transmis lors de l'infection peuvent persister à la fois dans le plasma et dans les cellules mononuclées sanguines pendant plus de deux ans (116). Cependant, certaines mutations transmises peuvent disparaître du plasma au cours du temps (117) alors qu'elles persistent dans les cellules mononuclées sanguines (5,6). Ainsi, le séquençage Sanger sur ADN a été parfois

proposé en complément du séquençage ARN, notamment chez les patients en échec virologique.

D'autre part, des mutations peuvent survenir dans l'ADN grâce à l'activité d'APOBEC3G/F, une protéine cellulaire qui entraîne des hypermutations G→A lors de la rétrotranscription de l'ADN (13,14,118,119). Si la substitution de la guanine par une adénine survient au niveau d'un codon codant pour le tryptophane (TGG), on obtient alors un codon stop (TGA ou TAG). La présence de codon stop est fréquente sur les séquences hypermutées mais ils peuvent aussi survenir lors de mutations ponctuelles. Cela aboutit à la présence de virus défectifs au sein des cellules mononuclées. Une étude a montré que les mutations M184I et E138K préexistent et peuvent être retrouvées avec une forte prévalence dans l'ADN proviral du fait de l'activité d'APOBEC3, même avant exposition aux antirétroviraux (120). Récemment, *Dauwe et al* ont apporté la preuve de l'hypermutation des séquences ADN, en comparant les mutations présentes sur ARN et sur ADN, par technique haut débit au séquençage Sanger sur ARN, notamment sur les gènes de la transcriptase inverse et de la protéase (121). De même, une équipe brésilienne a étudiée l'hypermutation chez des patients naïfs sur le gène codant pour l'intégrase et retrouve un taux d'hypermutation de 31,2% (122).

Les mutations supplémentaires retrouvées chez nos patients sont toutes situées sur des séquences contenant des codons stop. Ainsi, ces mutations peuvent potentiellement conduire à un biais dans l'interprétation de la résistance (121) et peuvent donc représenter un obstacle pour l'utilisation du séquençage de l'ADN-VIH en pratique clinique chez les patients naïfs.

2.2. Le tropisme viral

Dans cette étude, nous avons déterminé le tropisme viral sur ARN plasmatique et sur ADN proviral de 50 patients infectés par le VIH-1, naïfs de traitement, par méthode Sanger. La concordance entre ces deux techniques est très bonne ; cependant, une discordance a été observée pour trois patients (6%). De récentes études rapportent des taux de discordances allant de 3,4% à 16,4% (123–129).

La prévalence de virus X4 chez les patients naïfs varie de 3,2% à 19,4% (127,130,131). Dans ce travail, la prévalence de virus X4 est de 19% sur ARN et de 22,2% sur ADN. Généralement, l'émergence de virus à tropisme X4 est associée à une progression plus rapide de la maladie. Cependant, l'augmentation de la proportion de virus X4 n'est pas constante et sa cinétique diffère selon les compartiments (132). De nombreuses études ont retrouvé une proportion

de virus X4 plus importante dans l'ADN que dans l'ARN (123,126,133,134). Selon *Bon et al*, cette proportion augmente avec la durée de l'infection puisque chez les patients naïfs infectés récemment, la concordance entre le séquençage sur ARN et sur ADN est absolue, alors qu'en cas d'infection chronique, la proportion de virus X4 est plus importante dans l'ADN que dans l'ARN (133). Ces données montrent que les virus archivés dans le réservoir ne correspondent pas toujours aux virus circulants du fait de la compartimentation des virus (135).

Récemment, l'analyse de ces discordances dans la littérature a parfois été complétée par un séquençage haut débit et une analyse phylogénétique. Dans certains cas, les différentes séquences analysées proviennent du même groupe phylogénétique mais avec des virus ayant un mélange de séquences R5 et X4. Dans d'autres cas, les virus proviennent de deux ou trois groupes phylogénétiques distincts, chacun ayant une dominance de profil R5 ou X4. Les séquences R5-dominantes sont majoritairement retrouvées dans l'ARN alors que les séquences X4-dominantes sont majoritairement présentes dans l'ADN (129).

Une des limites de notre étude est que la technique Sanger ne permet pas de détecter la présence d'éventuels variants minoritaires. En effet, dans la littérature, plusieurs auteurs ont montré que les données du NGS sont plus spécifiques et plus sensibles dans la détection des populations R5X4 (101,136–139). Ces données peuvent avoir un impact clinique puisque des échecs à un traitement par Maraviroc ont été expliqués ultérieurement par la mise en évidence d'une sous population X4 ou R5X4, présente lors du séquençage initial, détectée uniquement par les techniques haut débit (136,138).

3. Apport du NGS dans la détection de mutations minoritaires sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de l'intégrase

Une très bonne concordance (>98%) a été retrouvée pour la détection des mutations entre le séquençage Sanger sur ARN et le NGS 20%. Les principales discordances entre les deux techniques sont dues à la meilleure sensibilité du NGS, permettant la détection de mutations supplémentaires, telle que la mutation N155H, mutation majeure, entraînant une résistance aux inhibiteurs de l'intégrase. Le NGS augmente aussi nettement la détection des mutations mineures sur le gène de la protéase puisqu'on passe de 222 mutations détectées en Sanger ARN à 273 en NGS 20%. Ces mutations ont un impact sur l'interprétation de la sensibilité des inhibiteurs de la protéase (93,1% de séquences sensibles en Sanger ARN versus 89,1% en NGS 20% avec ANRS). L'exhaustivité des mutations détectées est importante puisque la

présence de mutation de résistance chez les patients VIH-1 nouvellement diagnostiqués est associée à un risque important d'échec de la thérapie antivirale (3,4). De façon évidente, une augmentation du nombre de mutations est observée lorsque l'on diminue le seuil de détection des mutations à 5% et 1%, mais l'impact clinique des mutations présentes dans ces proportions n'a pas encore été clairement établi. De nombreux travaux ont évalué l'apport des techniques de séquençage haut débit dans la détection des mutations minoritaires sur les gènes de la transcriptase inverse et de la protéase (139–144), mais peu d'études ont été conduites sur les patients naïfs (145–148), ou sur le gène de l'intégrase (148). De façon uniforme, les données de la littérature retrouvent une supériorité du NGS dans le nombre de mutations détectées. Néanmoins, il paraît peu intéressant de comparer le séquençage Sanger au NGS avec des seuils de 5% ou 1%. Dans ce travail, nous avons analysé la corrélation entre la méthode Sanger et le NGS avec un seuil estimé équivalent (20%), et avons retrouvé une meilleure détection des mutations avec le NGS. Des travaux antérieurs ont retrouvé des données similaires chez les patients naïfs (147,148).

4. Impact des variants minoritaires sur l'issue du traitement antirétroviral

Les patients inclus dans ce travail ont été mis sous traitement antirétroviral majoritairement à base d'IP et d'II. Nos observations n'ont pas montré de lien entre les échecs virologiques et la préexistence de variants minoritaires de résistance. L'impact clinique des mutations minoritaires, détectées par les techniques de séquençage haut débit ou d'autres techniques ultrasensibles, a fait l'objet de plusieurs investigations. Le lien entre la présence de mutations minoritaires et l'échec du traitement antirétroviral instauré n'a pas encore été clairement démontré pour toutes les classes d'antirétroviraux. La plupart des travaux se sont intéressés à l'impact de la préexistence de mutations minoritaires associées à la résistance aux INNTI (149–161). Une revue systématique, analysant dix études et un total de 985 patients naïfs, a montré que la présence de variants minoritaires aux INNTI augmente par deux le risque d'échec virologique (149). De plus, cet effet est dose-dépendant (158,162). Le rôle des mutations K103N et Y181C a été particulièrement démontré (149,151,156,157,159,163). De façon similaire aux patients naïfs, la présence de variants minoritaires chez les patients traités augmente le risque d'échec virologique (163). Le risque d'échec a parfois été détecté pour de très faibles fréquences de variants minoritaires (<0,5% ou <10-99 copies de mutants /mL) (149,164). Le lien entre la présence de variants minoritaires et l'échec thérapeutique a été également démontré pour les femmes ayant

antérieurement reçu une dose unique de névirapine pour la prévention de la transmission mère-enfant. Ainsi, les femmes ayant les mutations minoritaires K103N et Y181C, avaient trois fois plus de risque d'échec virologique (165,166).

Si l'impact des variants minoritaires a été clairement établi pour les INNTI, il reste controversé pour les autres classes thérapeutiques. En effet, l'analyse d'une dizaine d'études portant sur les INTI, a montré que les variants minoritaires étaient associés à un risque légèrement accru d'échec virologique (1,6 fois), mais la plupart s'étaient concentrées uniquement sur les mutations M184V et K65R (149,150,167). Plusieurs auteurs ont retrouvé des résultats contraires, et il est actuellement impossible d'affirmer l'impact des mutations minoritaires de résistance aux INTI (147,167–169).

De façon semblable aux INNTI, les inhibiteurs de l'intégrase, notamment le raltégravir et l'élvitégravir, ont une barrière génétique faible à la résistance. Des mutations minoritaires ont été fréquemment retrouvées avant le traitement chez les patients ayant un échec virologique (170,171). Cependant, aucune association formelle n'a été démontrée quant à l'impact des variants minoritaires de résistance à ces molécules (97,172,173). Le dolutégravir, ayant une barrière génétique plus élevée, devrait être moins affecté. La trousse commerciale utilisée pour le séquençage de haut débit ne permet pas la détection de la mutation R263K dans le gène de l'intégrase (mutation mineure). En effet, les amorces de cette trousse ne permettent le séquençage du gène de l'intégrase qu'entre les positions 42 et 170. Des études ont évoqué le fait que la mutation R263K pourrait être une impasse évolutive pour le VIH (174–176). Cette mutation, confère une résistance de bas niveau au dolutégravir mais diminue la capacité répliquative du virus et l'activité enzymatique de son intégrase (176–178). Cette mutation a été recherchée par les techniques Sanger ADN et ARN et n'a pas été retrouvée chez nos patients. De plus, aucun patient de notre étude ayant un traitement contenant du dolutégravir n'a présenté d'échec thérapeutique.

Concernant les IP, les techniques ultrasensibles génèrent de très nombreuses mutations de résistance. Ces mutations sont détectées aussi bien chez les patients en échec virologique que chez les patients naïfs. Les données de la littérature actuellement disponibles ne montrent pas d'association entre la présence de variants minoritaires et l'échec virologique (150,159). Ce défaut d'association, peut être en partie expliqué par le fait que ces molécules, contrairement aux INNTI par exemple, ont une barrière génétique élevée à la résistance, et que leur résistance nécessite une sélection simultanée de plusieurs mutations (76).

Cependant d'autres facteurs pourraient également jouer un rôle sur les phénotypes de résistance. Ainsi, certains auteurs ont montré qu'une pression thérapeutique par des inhibiteurs de la protéase entraîne des mutations dans le gène *gag*, qui peuvent elles-même entraîner une résistance aux inhibiteurs de la protéase. Le phénomène est donc probablement plus complexe que la seule présence de mutation de résistance dans le gène étudié (87,179–181).

5. Obstacles à la mise en œuvre du séquençage de haut débit en routine

L'apport potentiel des techniques ultrasensibles, comme le séquençage haut débit, dans le génotypage de résistance du VIH est indéniable. Plusieurs optimisations techniques ont été réalisées pour permettre leur utilisation en clinique (143,182). Néanmoins, des efforts sont encore nécessaires pour maîtriser certains aspects avant leur mise en œuvre en routine dans les laboratoires de virologie clinique. Ainsi, le délai de réalisation de la technique NGS reste assez important. En effet, selon une évaluation récente dans notre laboratoire (voir Annexe 2), le temps total requis pour le séquençage d'un échantillon avec le protocole 454-Roche®, est estimé à 3,3 fois plus long que le séquençage par méthode Sanger (31,67 h versus 9,67 h). Des données de la littérature retrouvent également un temps technique plus élevé pour le NGS, environ 29 h contre 9,25 h, dans une étude dont la conception est assez proche de la nôtre, mais dont les auteurs n'avaient étudié que les gènes de la protéase et de la transcriptase inverse (143) ; et près de 37 h versus 9,25 h, dans une étude avec un design « maison » (140). Le temps technique peut être réduit en analysant quatre plaques, soit 48 échantillons, au cours d'une même série de séquençage haut débit. Cependant, l'analyse d'un aussi grand nombre de prélèvements en parallèle est incompatible avec le fonctionnement d'un laboratoire clinique, avec notamment, la nécessité d'obtenir des résultats rapidement. Une approche de solution serait l'utilisation de plateformes permettant de combiner plusieurs virus (VIH, VHB, VHC) au cours d'une même série de séquençage.

Par ailleurs, le temps « technicien », c'est-à-dire la durée des manipulations nécessitant une main-d'œuvre humaine, est approximativement 9 fois plus important pour le protocole NGS (12,5 h versus 1,33 h). Cependant, ce temps technique est essentiellement lié aux étapes de préparation des librairies. Ces étapes peuvent être automatisées, permettant ainsi de réduire le temps « technicien » de manière significative (183). Une réduction du temps technique, rendra également le NGS compétitif sur le plan financier, car le coût des réactifs

par patient peut-être inférieur à celui du séquençage Sanger (estimation à 67 euros par pyroséquençage 454 contre 113 euros pour la technique Sanger) (143,182). En outre, les solutions commerciales actuellement disponibles doivent encore être optimisées pour les échantillons dont la charge virale est inférieure à 2000 copies /mL. Après avoir surmonté ces quelques obstacles, le séquençage de haut débit pourra être intégré à la pratique courante.

6. Différences de prédiction entre les algorithmes d'interprétation

Enfin, dans ce travail, nous avons relevé des différences d'interprétation entre les principaux algorithmes utilisés, comme décrit précédemment (20,143,184,185). Ces écarts sont susceptibles d'augmenter avec l'utilisation de méthodes plus sensibles telles que le NGS, du fait de l'augmentation importante du nombre de mutations détectées. Nous avons mis en évidence que l'ANRS était l'algorithme le plus sévère en ce qui concerne les antiprotéases, alors que les interprétations de l'algorithme de Stanford impactent plus sévèrement les inhibiteurs de l'intégrase. Ces variations entre algorithmes sont dues à quelques différences dans les mutations prises en compte, notamment pour les mutations mineures. La liste des mutations est régulièrement mise à jour selon les données de la littérature, mais les algorithmes ne donnent parfois pas la même importance à une même mutation.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons évalué le potentiel du séquençage de l'ADN proviral par méthode Sanger, et du séquençage haut débit de l'ARN plasmatique, pour la détection de mutations associées à la résistance chez les patients VIH-1 naïfs, en comparaison à la technique de routine, le séquençage de l'ARN plasmatique par méthode Sanger. Nous avons montré que le séquençage Sanger sur ADN n'améliore pas, de manière significative, la détection des mutations associées aux résistances chez les patients naïfs, et peut même conduire à des biais d'interprétation. Par contre, le séquençage haut débit, comparé à la méthode de routine, permet d'augmenter significativement la détection des mutations. Peu d'échecs virologiques au traitement antirétroviral instauré ont été observés dans cette étude ; et ils ne sont pas associés aux mutations minoritaires présentes avant le début du traitement. La principale question actuelle est le seuil cliniquement pertinent à retenir pour les variants minoritaires. Si les données existantes montrent un impact réel des mutations minoritaires, même à très faibles taux sur les INNTI, l'intérêt n'est pas encore démontré pour les autres classes de molécules. Il est donc nécessaire de définir un consensus pour éviter de submerger le clinicien de données parfois sans intérêt, pouvant priver le patient de certaines lignes de traitement. De plus, des optimisations techniques, notamment l'automatisation de certaines étapes, restent nécessaires pour la mise en œuvre en routine. Les différents algorithmes d'interprétation disponibles peuvent faire des prédictions différentes et il est important de connaître les forces et les limites de chaque algorithme, voire de les harmoniser. L'émergence de résistance chez les patients sera encore un problème d'actualité pendant de longues années. Les techniques ultrasensibles ne sont certainement pas indispensables pour tous les patients. Néanmoins, avec l'amélioration des techniques de détection des populations minoritaires, il est possible d'espérer une prise en charge personnalisée pour chaque patient en fonction de son statut immunitaire, virologique, et de son histoire thérapeutique, afin de cibler au mieux les molécules actives. Il est également envisageable, avec ces solutions, d'effectuer un séquençage du génome complet afin d'étudier l'ensemble des mutations de résistance et les clusters de transmission.

Annexes

Annexe 1 : Liste des évènements classant Sida (CDC, 1993)

Candidose bronchique, trachéale ou pulmonaire	Sarcome de Kaposi
Candidose de l'œsophage	Lymphome de Burkitt
Cancer invasif du col	Lymphome immunoblastique
Coccidioïdomycose disséminée ou extra-pulmonaire	Lymphome cérébral primitif
Cryptococcose extra-pulmonaire	Infection à <i>Mycobacterium avium</i> ou <i>kansasii</i> , disséminée ou extra-pulmonaire
Cryptosporidiose intestinale supérieure à 1 mois	Infection à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , quel que soit le site (pulmonaire ou extra-pulmonaire)
Infection à CMV (autre que foie, rate ou ganglions)	Infection à mycobactérie, identifiée ou non, disséminée ou extra-pulmonaire
Rétinite à CMV (avec perte de vision)	Pneumonie à <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Encéphalopathie dûe au VIH	Pneumopathie bactérienne récurrente
Infection herpétique, ulcères chroniques supérieurs à 1 mois ; ou bronchique, pulmonaire ou oesophagienne	Leuco-encéphalite multifocale progressive
Histoplasmose disséminée ou extra-pulmonaire	Septicémie à <i>Salmonella non typhi</i> récurrente
Isosporidiose intestinale chronique (supérieure à 1 mois)	Toxoplasmose cérébrale
	Syndrome cachectique dû au VIH

Annexe 2 : Comparaison du temps/échantillon nécessaire au séquençage Sanger et en séquençage haut débit.

Etape	Séquençage haut débit	Temps (h) / échantillon	Sanger	Temps (h) / échantillon
Extraction +/- purification	QIAamp® Viral RNA mini kit + Agencourt RNA Clean XP®	0,31	QIAamp® Viral RNA mini kit	0,12
Obtention des ADNc	Préparation de la librairie +Agencourt AMPure kit +Quantification Picogreen	6,27	RT-PCR	2,17
Amplification	PCR en émulsion "Fast Start High Fidelity PCR System"	7,50	PCR	1,70
Purification	emPCR Kit Bead Recovery Reagents	4,00	NucleoFast 96®	1,33
			Electrophorèse	1,17
Préparation de la réaction de séquence	Sequencing Kit "Reagent and Enzymes" + "Packing Beads and Supplement CB"	3,17	BigDye® Terminator v3.1	2,35
Durée du run	454-GS Junior®	10,00	3500Dx Genetic Analyzer®	0,50
Analyse des données	Amplicon Variant Analyzer + DeepChek®	0,42	SeqScape + ViroScore®	0,34
Total		31,67		9,67

Bibliographie

1. OMS | VIH/sida [Internet]. WHO. [cited 2017 Feb 23]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>
2. France, Ministère des affaires sociales et de la santé (2012-....), Morlat P. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH Rapport 2013: recommandations du groupe d'experts. Paris: DILA - Direction de l'information légale et administrative : La documentation française; 2013.
3. Little SJ, Holte S, Routy J-P, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, et al. Antiretroviral-Drug Resistance among Patients Recently Infected with HIV. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):385–94.
4. Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, de Luca A, et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):363–71.
5. Bon I, Gibellini D, Borderi M, Alessandrini F, Vitone F, Schiavone P, et al. Genotypic resistance in plasma and peripheral blood lymphocytes in a group of naive HIV-1 patients. *J Clin Virol*. 2007 Apr;38(4):313–20.
6. Vicenti I, Razzolini F, Saladini F, Romano L, Zazzi M. Use of Peripheral Blood DNA for Genotype Antiretroviral Resistance Testing in Drug-Naive HIV-Infected Subjects. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 15;44(12):1657–61.
7. Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, et al. Both Human Immunodeficiency Virus Cellular DNA Sequencing and Plasma RNA Sequencing Are Useful for Detection of Drug Resistance Mutations in Blood Samples from Antiretroviral-Drug-Naive Patients. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1783–8.
8. Lübke N, Di Cristanziano V, Sierra S, Knops E, Schülter E, Jensen B, et al. Proviral DNA as a Target for HIV-1 Resistance Analysis. *Intervirology*. 2015 Jun 27;58(3):184–9.
9. Lambert-Niclot S, Allavena C, Grude M, Flandre P, Sayon S, Andre E, et al. Usefulness of an HIV DNA resistance genotypic test in patients who are candidates for a switch to the rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate combination. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Aug;71(8):2248–51.
10. Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere M, de Castro N, et al. Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med*. 2012 Oct 1;13(9):517–25.
11. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;10(4):279–90.
12. Janini M, Rogers M, Birx DR, McCutchan FE. Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Sequences Genetically Damaged by Hypermutation Are Often Abundant in Patient

- Peripheral Blood Mononuclear Cells and May Be Generated during Near-Simultaneous Infection and Activation of CD4+ T Cells. *J Virol*. 2001 Sep;75(17):7973–86.
13. Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, Han Y, Ray SC, Siliciano RF. G→A Hypermutation in Protease and Reverse Transcriptase Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Residing in Resting CD4+ T Cells In Vivo. *J Virol*. 2005 Feb;79(3):1975–80.
 14. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003 Jul 3;424(6944):99–103.
 15. Larder BA, Kohli A, Kellam P, Kemp SD, Kronick M, Henfrey RD. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature*. 1993 Oct 14;365(6447):671–3.
 16. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, et al. Multiple, Linked Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Treatment-Experienced Patients Are Missed by Standard Genotype Analysis. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan 1;43(1):406–13.
 17. Church JD, Jones D, Flys T, Hoover D, Marlowe N, Chen S, et al. Sensitivity of the ViroSeq HIV-1 Genotyping System for Detection of the K103N Resistance Mutation in HIV-1 Subtypes A, C, and D. *J Mol Diagn*. 2006 Sep;8(4):430–2.
 18. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008 Sep;9(1):387–402.
 19. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31–46.
 20. Jiamsakul A, Kantor R, Li PC, Sirivichayakul S, Sirisanthana T, Kantipong P, et al. Comparison of predicted susceptibility between genotype and virtual phenotype HIV drug resistance interpretation systems among treatment-naive HIV-infected patients in Asia: TASER-M cohort analysis. *BMC Res Notes*. 2012;5:582.
 21. Veronika G. History Of Aids. Lulu.com; 2013. 321 p.
 22. Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Sci* 1983. (220):868–71.
 23. Clavel F., Guétard D., Brun-Vézinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Sci* 1986. (233):343–6.
 24. News - Annual epidemiological report 2014 - Sexually... [Internet]. [cited 2016 Jul 13]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispatchForm.aspx?
 25. Cazein F, Pillonel J, Le Strat Y, Pinget R, Le Vu S, Brunet S. Bulletin épidémiologique hebdomadaire [Internet]. 2016 [cited 2016 Jul 17]. Available from: http://www.invs.sante.fr/beh/2015/9-10/2015_9-10_1.html

26. Infection par le VIH et les IST bactériennes. Point épidémiologique du 29 novembre 2016. / Actualités / Infection à VIH et sida / VIH-sida / IST / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil [Internet]. [cited 2017 Feb 23]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infection-a-VIH-et-sida/Actualites/Infection-par-le-VIH-et-les-IST-bacteriennes.-Point-epidemiologique-du-29-novembre-2016>
27. Supervie V, Ekouevi DK. [Overview of the HIV epidemics in France and worldwide]. *Rev Prat.* 2014 Oct;64(8):1060–6.
28. 90-90-90: Une cible ambitieuse de traitement pour aider à mettre fin à l'épidémie du sida | ONUSIDA [Internet]. Available from: <http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2014/90-90-90>
29. Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Delaporte C. La diversité génétique du VIH1. *Virologie.* 2000 Oct 20;4(5):371–81.
30. C. Amiel, V. Schneider. Virus de l'immunodéficience humaine. *Biol Médicale.* 90-55-0145.
31. Pancera M. Structure, function and antigenicity of the HIV1 envelope glycoproteins. *Virologie.* 2005 Nov 1;9(6):457–72.
32. Charpentier C, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. Virus de l'immunodéficience humaine. *EMC - Mal Infect.* 2011 Jan;8(4):1–12.
33. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Aug;2(8).
34. Saphire ACS, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Galloway PA. Syndecans Serve as Attachment Receptors for Human Immunodeficiency Virus Type 1 on Macrophages. *J Virol.* 2001 Oct;75(19):9187–200.
35. Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* 1999 Apr 1;7(4):144–9.
36. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral Mutation Rates. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9733–48.
37. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9864.
38. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. From the Cover: Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 23;101(12):4204.
39. Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. Diversité génétique des VIH et ses conséquences. *Pathol Biol.* 2009 Mar;57(2):142–8.
40. Peeters M, Chaix M-L. Origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine : d'où vient-il, ou va-t-il ? *Virologie.* 2013 May 1;17(3):119–31.
41. Lucas E, Cazein F, Brunet S, thierry D. Types, groupes et sous-types de VIH diagnostiqués en France depuis 2003 : données de huit années de surveillance. In: *Bulletin*

- Epidémiologique Hebdomadaire [Internet]. 2012. p. 46–7. Available from: [http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/\(id\)/PMB_11146](http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/(id)/PMB_11146)
42. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix M-L, Deveau C, et al. CD4 Cell Count and HIV DNA Level Are Independent Predictors of Disease Progression after Primary HIV Type 1 Infection in Untreated Patients. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):709–15.
 43. Rouzioux C, Hubert J-B, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, et al. Early Levels of HIV-1 DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Predictive of Disease Progression Independently of HIV-1 RNA Levels and CD4+ T Cell Counts. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1;192(1):46–55.
 44. Chéret A. Prise en charge de la primo-infection VIH-1. *J Anti-Infect*. 2015 Dec;17(4):163–72.
 45. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and Epidemiologic Features of Primary HIV Infection. *Ann Intern Med*. 1996 Aug 15;125(4):257–64.
 46. Ghosn J, Katlama C. Prise en charge de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *EMC - Mal Infect*. 2012 Nov;9(4):1–12.
 47. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults [Internet]. [cited 2017 Jan 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>
 48. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):727–8.
 49. Chun T-W, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, Collier AC, et al. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS Lond Engl*. 2010 Nov 27;24(18):2803.
 50. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathog*. 2013 Feb;9(2).
 51. Ganesan A, Chattopadhyay PK, Brodie TM, Qin J, Gu W, Mascola JR, et al. Immunological and Virological Events in Early HIV Infection Predict Subsequent Rate of Progression. *J Infect Dis*. 2010 Jan 15;201(2):272.
 52. Alidjinou EK, Bocket L, Hober D. Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: A review of relevant clinical uses and laboratory methods. *Pathol Biol*. 2015 Feb;63(1):53–9.
 53. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad*. 2015 Apr;1(2):59–66.
 54. Josefsson L, Dahl V, Palmer S. Can HIV infection be eradicated through use of potent antiviral agents? *Curr Opin Infect Dis*. 2010 Dec;23(6):628–32.
 55. Sluis-Cremer N. Therapeutic Approaches to Eradicate Latent HIV-1 in Resting CD4+ T Cells. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(10):1191–7.

56. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev.* 2013 Jul;254(1):326.
57. Schuitemaker H, van 't Wout AB, Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J Transl Med.* 2011 Jan 27;9(Suppl 1):S5.
58. Mariani SA, Vicenzi E, Poli G. Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4+ T lymphocytes. *J Transl Med.* 2011 Jan 27;9(Suppl 1):S8.
59. Loftin LM, Kienzle M, Yi Y, Collman RG. R5X4 HIV-1 coreceptor use in primary target cells: implications for coreceptor entry blocking strategies. *J Transl Med.* 2011 Jan 27;9(Suppl 1):S3.
60. Lin NH, Kuritzkes DR. Tropism Testing in the Clinical Management of HIV-1 Infection. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009 Nov;4(6):481.
61. Haute Autorité de Santé - Dépistage de l'infection par le VIH en France : stratégies et dispositif de dépistage [Internet]. [cited 2016 Jul 26]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_866949/fr/depistage-de-l-infection-par-le-vih-en-france-strategies-et-dispositif-de-depistage
62. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Günthard HF, Lam RY, et al. Effect of Treatment, during Primary Infection, on Establishment and Clearance of Cellular Reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis.* 2005 May 1;191(9):1410–8.
63. Hocqueloux L, Avettand-Fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother.* 2013 May 1;68(5):1169–78.
64. Steingrover R, Pogány K, Fernandez Garcia E, Jurriaans S, Brinkman K, Schuitemaker H, et al. HIV-1 viral rebound dynamics after a single treatment interruption depends on time of initiation of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2008 Aug 20;22(13):1583–8.
65. Pantazis N, Touloumi G, Meyer L, Olson A, Costagliola D, Kelleher AD, et al. The impact of transient combination antiretroviral treatment in early HIV infection on viral suppression and immunologic response in later treatment. *AIDS Lond Engl.* 2016 Mar 27;30(6):879–88.
66. Hecht FM, Wang L, Collier A, Little S, Markowitz M, Margolick J, et al. A Multicenter Observational Study of the Potential Benefits of Initiating Combination Antiretroviral Therapy during Acute HIV Infection. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15;194(6):725–33.
67. SPARTAC Trials Investigators, Fidler S, Porter K, Ewings F, Frater J, Ramjee G, et al. Short-Course Antiretroviral Therapy in Primary HIV Infection. *N Engl J Med.* 2013 Jan 17;368(3):207–17.
68. Walker BD, Hirsch MS. Antiretroviral Therapy in Early HIV Infection. *N Engl J Med.* 2013 Jan 17;368(3):279–81.
69. Singh K, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Sarafianos SG. Structural Aspects of Drug Resistance and Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Viruses.* 2010 Feb;2(2):606.

70. Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res.* 2008 Jun;134(1–2):147–56.
71. Ali A, Bandaranayake RM, Cai Y, King NM, Kolli M, Mittal S, et al. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease. *Viruses.* 2010 Nov;2(11):2509.
72. D SL, Cervia JS, Smith MA. Enfuvirtide (T-20): A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitor. *Clin Infect Dis.* 2003 Oct 15;37(8):1102–6.
73. MacArthur RD, Novak RM. Maraviroc: The First of a New Class of Antiretroviral Agents. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 15;47(2):236–41.
74. Profit L. Maraviroc: the evidence for its potential in the management of HIV. *Core Evid.* 2007;2(1):1.
75. Palich R, Ghosn J. Suivi et prise en charge thérapeutique de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. 2016 May 11;
76. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs.* 2012 Sep;72(9):e1.
77. Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Vézinet FB, Clotet B, Hammer SM, et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 15;47(2):266–85.
78. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463–7.
79. Archer J, Weber J, Henry K, Winner D, Gibson R, Lee L, et al. Use of Four Next-Generation Sequencing Platforms to Determine HIV-1 Coreceptor Tropism. *PLoS ONE.* 2012 ; 7(11).
80. Gibson RM, Meyer AM, Winner D, Archer J, Feyertag F, Ruiz-Mateos E, et al. Sensitive Deep-Sequencing-Based HIV-1 Genotyping Assay To Simultaneously Determine Susceptibility to Protease, Reverse Transcriptase, Integrase, and Maturation Inhibitors, as Well as HIV-1 Coreceptor Tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Apr;58(4):2167–85.
81. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science.* 1987 Oct 16;238(4825):336–41.
82. Luckey J., Drossman H, Kostichka A J, Mead D., D’Cunha J, Norris T., et al. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1990;(18):4417–21.
83. Leong IUS, Skinner JR, Love DR. Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Med Sci.* 2014 Jun 13;2(2):98–126.
84. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature.* 2005 Sep 15;437(7057):376–80.

85. Shao W, Boltz VF, Spindler JE, Kearney MF, Maldarelli F, Mellors JW, et al. Analysis of 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA. *Retrovirology*. 2013;10:18.
86. Balzer S, Malde K, Lanzén A, Sharma A, Jonassen I. Characteristics of 454 pyrosequencing data—enabling realistic simulation with flowsim. *Bioinformatics*. 2010 Sep 15;26(18):i420–5.
87. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res*. 2007 Aug;17(8):1195–201.
88. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 21;475(7356):348–52.
89. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(16):e105.
90. Naeger LK, Margot NA, Miller MD. ATP-Dependent Removal of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul 1;46(7):2179–84.
91. Picard V, Angelini E, Maillard A, Race E, Clavel F, Chêne G, et al. Comparison of Genotypic and Phenotypic Resistance Patterns of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Stavudine and Didanosine or Zidovudine and Lamivudine. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):781–4.
92. Wensing A, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top Antivir Med IAS-USA*. 2015;23.
93. Schinazi RF, Lloyd RM, Jr, Nguyen MH, Cannon DL, McMillan A, et al. Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Apr;37(4):875.
94. Dykes C, Fox K, Lloyd A, Chiulli M, Morse E, Demeter LM. Impact of Clinical Reverse Transcriptase Sequences on the Replication Capacity of HIV-1 Drug-Resistant Mutants. *Virology*. 2001 Jul 5;285(2):193–203.
95. Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, Fofana DB, Soulié C, Fourati S, et al. Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naïve patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Jun 1;68(6):1237–42.
96. Sista P, Wasikowski B, Lecocq P, Pattery T, Bacheler L. The HIV-1 protease resistance mutation I50L is associated with resistance to atazanavir and susceptibility to other protease inhibitors in multiple mutational contexts. *J Clin Virol*. 2008 Aug;42(4):405–8.
97. Nguyen TTN, Rato S, Molina J-M, Clavel F, Delaugerre C, Mammano F. Impact of the HIV integrase genetic context on the phenotypic expression and in vivo emergence of raltegravir resistance mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar 1;70(3):731–8.

98. Seki T, Suyama-Kagitani A, Kawauchi-Miki S, Miki S, Wakasa-Morimoto C, Akihisa E, et al. Effects of Raltegravir or Elvitegravir Resistance Signature Mutations on the Barrier to Dolutegravir Resistance In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Feb 17;59(5):2596–606.
99. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Aug 1;54(2):333–40.
100. Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, et al. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS Lond Engl.* 2004 Sep 3;18(13):1787–94.
101. Recordon-Pinson P, Raymond S, Bellecave P, Marcelin AG, Soulie C, Descamps D, et al. HIV-1 Dynamics and Coreceptor Usage in Maraviroc-Treated Patients with Ongoing Replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):930–5.
102. Jensen MA, Li F-S, 'tWout AB van, Nickle DC, Shriner D, He H-X, et al. Improved Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motif Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env V3 Loop Sequences. *J Virol.* 2003 Dec 15;77(24):13376–88.
103. Delobel P, Nugeyre M-T, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, et al. Population-Based Sequencing of the V3 Region of env for Predicting the Coreceptor Usage of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Quasispecies. *J Clin Microbiol.* 2007 May;45(5):1572.
104. Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, et al. Determining Human Immunodeficiency Virus Coreceptor Use in a Clinical Setting: Degree of Correlation between Two Phenotypic Assays and a Bioinformatic Model. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):279.
105. Soulié C, Derache A, Aimé C, Marcelin A-G, Carcelain G, Simon A, et al. Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism. *HIV Med.* 2008 Jan;9(1):1–5.
106. Zagordi O, Klein R, Däumer M, Beerenwinkel N. Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies. *Nucleic Acids Res.* 2010 Nov;38(21):7400–9.
107. Di Giallonardo F, Zagordi O, Duport Y, Leemann C, Joos B, Künzli-Gontarczyk M, et al. Next-Generation Sequencing of HIV-1 RNA Genomes: Determination of Error Rates and Minimizing Artificial Recombination. *PLoS ONE.* 2013 Sep 18;8(9).
108. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159–74.
109. Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I, Garcia F, Struck D, et al. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016 Mar 1;62(5):655–63.
110. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance: 2009 Update. Nixon DF, editor. *PLoS ONE.* 2009 Mar 6;4(3):e4724.

111. Frange P, Assoumou L, Descamps D, Chéret A, Goujard C, Tran L, et al. HIV-1 subtype B-infected MSM may have driven the spread of transmitted resistant strains in France in 2007–12: impact on susceptibility to first-line strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jul 1;70(7):2084–9.
112. Diallo K, Murillo WE, de Rivera IL, Albert J, Zhou Z, Nkengasong J, et al. Comparison of HIV-1 resistance profiles in plasma RNA versus PBMC DNA in heavily treated patients in Honduras, a resource-limited country. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012 Feb 28;3(1):56–65.
113. Derache A, Shin H-S, Balamane M, White E, Israelski D, Klausner JD, et al. HIV Drug Resistance Mutations in Proviral DNA from a Community Treatment Program. *PLoS ONE* . 2015 Jan 30;10(1).
114. Wirden M, Soulie C, Valantin M-A, Fourati S, Simon A, Lambert-Niclot S, et al. Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Apr 1;66(4):709–12.
115. Saracino A, Gianotti N, Marangi M, Cibelli DC, Galli A, Punzi G, et al. Antiretroviral genotypic resistance in plasma RNA and whole blood DNA in HIV-1 infected patients failing HAART. *J Med Virol.* 2008 Oct 1;80(10):1695–706.
116. Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, Deveau C, Viard J-P, Galimand J, et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS Lond Engl.* 2006 Jan 9;20(2):159–70.
117. Yanik EL, Napravnik S, Hurt CB, Dennis A, Quinlivan EB, Sebastian J, et al. Prevalence of Transmitted Antiretroviral Drug Resistance Differs Between Acutely and Chronically HIV-Infected Patients: *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Oct;61(2):258–62.
118. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology.* 2015 May;479–480:131–45.
119. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002 Aug 8;418(6898):646–50.
120. Fourati S, Malet I, Lambert-Niclot S, et al. E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase coemerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure. *AIDS Lond Engl.* 2012;(26):1619–24.
121. Dauwe K, Staelens D, Vancoillie L, Mortier V, Verhofstede C. Deep Sequencing of HIV-1 RNA and DNA in Newly Diagnosed Patients with Baseline Drug Resistance Showed No Indications for Hidden Resistance and Is Biased by Strong Interference of Hypermutation. *J Clin Microbiol.* 2016 Jun;54(6):1605.
122. de Lima-Stein ML, Alkmim WT, Bizinoto MC de S, Lopez LF, Burattini MN, Maricato JT, et al. In Vivo HIV-1 Hypermutation and Viral Loads Among Antiretroviral-Naive Brazilian Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014 Sep 1;30(9):867–80.

123. Baumann RE, Rogers AA, Hamdan HB, Burger H, Weiser B, Gao W, et al. Determination of HIV-1 coreceptor tropism using proviral DNA in women before and after viral suppression. *AIDS Res Ther.* 2015 Apr 18 ;12.
124. Gupta S, Neogi U, Srinivasa H, Shet A. High concordance of genotypic coreceptor prediction in plasma-viral RNA and proviral DNA of HIV-1 subtype C: implications for use of whole blood DNA in resource-limited settings. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Sep 1;68(9):2003–6.
125. Ferrer P, Montecinos L, Tello M, Tordecilla R, Rodríguez C, Ferrés M, et al. HIV-1 tropism: a comparison between RNA and proviral DNA in routine clinical samples from Chilean patients. *Virology.* 2013 Oct 28;10:318.
126. Verhofstede C, Brudney D, Reynaerts J, Vaira D, Fransen K, De Bel A, et al. Concordance between HIV-1 genotypic coreceptor tropism predictions based on plasma RNA and proviral DNA. *HIV Med.* 2011 Oct;12(9):544–52.
127. Parisi SG, Andreoni C, Sarmati L, Boldrin C, Buonomini AR, Andreis S, et al. HIV Coreceptor Tropism in Paired Plasma, Peripheral Blood Mononuclear Cell, and Cerebrospinal Fluid Isolates from Antiretroviral-Naïve Subjects[▽]. *J Clin Microbiol.* 2011 Apr;49(4):1441–5.
128. Fabeni L, Berno G, Svicher V, Ceccherini-Silberstein F, Gori C, Bertoli A, et al. Genotypic Tropism Testing in HIV-1 Proviral DNA Can Provide Useful Information at Low-Level Viremia. *J Clin Microbiol.* 2015 Sep;53(9):2935–41.
129. Kotani H, Sudo K, Hasegawa N, Fujiwara H, Hayakawa T, Iketani O, et al. Possible involvement of distinct phylogenetic clusters of HIV-1 variants in the discrepancies between coreceptor tropism predictions based on viral RNA and proviral DNA. *J Pharm Health Care Sci.* 2016 Dec;2(1).
130. Eshleman SH, Husnik M, Hudelson S, Donnell D, Huang Y, Huang W, et al. Antiretroviral drug resistance, HIV-1 tropism, and HIV-1 subtype among men who have sex with men with recent HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 2007 May 31;21(9):1165–74.
131. de Mendoza C, Rodriguez C, García F, Eiros JM, Ruíz L, Caballero E, et al. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):698–704.
132. Saracino A, Monno L, Scudeller L, Bruno G, Ladisa N, Punzi G, et al. X4 viruses are frequently archived in patients with long-term HIV infection but do not seem to influence the “inflamm-aging” process. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):220.
133. Bon I, Turriziani O, Musumeci G, Clò A, Montagna C, Morini S, et al. HIV-1 coreceptor usage in paired plasma RNA and proviral DNA from patients with acute and chronic infection never treated with antiretroviral therapy. *J Med Virol.* 2015 Feb 1;87(2):315–22.
134. Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen VV, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, et al. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Feb 1;50(2):126–36.

135. Pou C, Codoñer FM, Thielen A, Bellido R, Pérez-Álvarez S, Cabrera C, et al. HIV-1 Tropism Testing in Subjects Achieving Undetectable HIV-1 RNA: Diagnostic Accuracy, Viral Evolution and Compartmentalization. Landay A, editor. PLoS ONE. 2013 Aug 1;8(8):e67085.
136. Rodriguez C, Soulié C, Marcelin A-G, Calvez V, Descamps D, Charpentier C, et al. HIV-1 Coreceptor Usage Assessment by Ultra-Deep Pyrosequencing and Response to Maraviroc. PLoS ONE. 2015 Jun 11;10(6).
137. Gonzalez-Serna A, McGovern RA, Harrigan PR, Vidal F, Poon AFY, Ferrando-Martinez S, et al. Correlation of the Virological Response to Short-Term Maraviroc Monotherapy with Standard and Deep-Sequencing-Based Genotypic Tropism Prediction Methods. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Mar;56(3):1202.
138. Swenson LC, Chui CKS, Brumme CJ, Chan D, Woods CK, Mo T, et al. Genotypic Analysis of the V3 Region of HIV from Virologic Nonresponders to Maraviroc-Containing Regimens Reveals Distinct Patterns of Failure. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Dec;57(12):6122.
139. St. John EP, Simen BB, Turenchalk GS, Braverman MS, Abbate I, Aerssens J, et al. A Follow-Up of the Multicenter Collaborative Study on HIV-1 Drug Resistance and Tropism Testing Using 454 Ultra Deep Pyrosequencing. PLoS ONE. 2016 Jan 12;11(1).
140. Stelzl E, Pröll J, Bizon B, Niklas N, Danzer M, Hackl C, et al. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: Evaluation of a new ultra-deep sequencing-based protocol and comparison with the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit. J Virol Methods. 2011 Dec;178(1–2):94–7.
141. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landry ML, et al. Low-Abundance HIV Drug-Resistant Viral Variants in Treatment-Experienced Persons Correlate with Historical Antiretroviral Use. PLoS ONE. 2009 Jun 29;4(6).
142. Garcia-Diaz A, Guerrero-Ramos A, McCormick AL, Macartney M, Conibear T, Johnson MA, et al. Evaluation of the Roche prototype 454 HIV-1 ultradeep sequencing drug resistance assay in a routine diagnostic laboratory. J Clin Virol. 2013 Oct;58(2):468–73.
143. Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure: AIDS. 2014 Jun;28(9):1315–24.
144. Simen BB, Braverman MS, Abbate I, Aerssens J, Bidet Y, Bouchez O, et al. An international multicenter study on HIV-1 drug resistance testing by 454 ultra-deep pyrosequencing. J Virol Methods. 2014 Aug;204:31–7.
145. Geretti AM, Conibear T, Hill A, Johnson JA, Tambuyzer L, Thys K, et al. Sensitive testing of plasma HIV-1 RNA and Sanger sequencing of cellular HIV-1 DNA for the detection of drug resistance prior to starting first-line antiretroviral therapy with etravirine or efavirenz. J Antimicrob Chemother. 2014 Apr 1;69(4):1090–7.
146. Fernández-Caballero J-A, Chueca N, Alvarez M, Gonzalez D, García F. Use of deep sequencing data for routine analysis of HIV resistance in newly diagnosed patients. J Int AIDS Soc. 2014 Nov 2;17(4Suppl 3).

147. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, Schnittman S, Wirtz V, Uy J, et al. Prevalence and Clinical Significance of HIV Drug Resistance Mutations by Ultra-Deep Sequencing in Antiretroviral-Naïve Subjects in the CASTLE Study. *PLoS ONE*. 2010 Jun 3;5(6).
148. Garcia-Diaz A, McCormick A, Booth C, Gonzalez D, Sayada C, Haque T, et al. Analysis of transmitted HIV-1 drug resistance using 454 ultra-deep-sequencing and the DeepChek®-HIV system. *J Int AIDS Soc*. 2014 Nov 2;17(4(Suppl 3)).
149. Li JZ. Low-Frequency HIV-1 Drug Resistance Mutations and Risk of NNRTI-Based Antiretroviral Treatment Failure: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA*. 2011 Apr 6;305(13):1327.
150. Li JZ, Kuritzkes DR. Clinical Implications of HIV-1 Minority Variants. *Clin Infect Dis*. 2013 Jun 1;56(11):1667–74.
151. Paredes R, Lalama CM, Ribaldo HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguel F, et al. Pre-existing Minority Drug-Resistant HIV-1 Variants, Adherence, and Risk of Antiretroviral Treatment Failure. *J Infect Dis*. 2010 Mar 1;201(5):662–71.
152. Geretti AM, Fox ZV, Booth CL, Smith CJ, Phillips AN, Johnson M, et al. Low-frequency K103N strengthens the impact of transmitted drug resistance on virologic responses to first-line efavirenz or nevirapine-based highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2009 Dec;52(5):569–73.
153. Jakobsen MR, Tolstrup M, Søgaard OS, Jørgensen LB, Gorry PR, Laursen A, et al. Transmission of HIV-1 Drug-Resistant Variants: Prevalence and Effect on Treatment Outcome. *Clin Infect Dis*. 2010 Feb 15;50(4):566–73.
154. Peuchant O, Thiébaud R, Capdepon S, Lavignolle-Aurillac V, Neau D, Morlat P, et al. Transmission of HIV-1 minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl*. 2008 Jul 31;22(12):1417–23.
155. Bellecave P, Recordon-Pinson P, Papuchon J, Vandenhende M-A, Reigadas S, Tazuin B, et al. Detection of Low-Frequency HIV Type 1 Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations by Ultradeep Sequencing in Naive HIV Type 1-Infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Feb;30(2):170–3.
156. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, Yerly S, et al. Minority Quasispecies of Drug-Resistant HIV-1 That Lead to Early Therapy Failure in Treatment-Naive and -Adherent Patients. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 15;48(2):239–47.
157. Johnson JA, Li J-F, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, et al. Minority HIV-1 Drug Resistance Mutations Are Present in Antiretroviral Treatment-Naïve Populations and Associate with Reduced Treatment Efficacy. *PLoS Med*. 2008 Jul 29;5(7):e158.
158. Goodman DD, Zhou Y, Margot NA, McColl DJ, Zhong L, Borroto-Esoda K, et al. Low level of the K103N HIV-1 above a threshold is associated with virological failure in treatment-naive individuals undergoing efavirenz-containing therapy. *AIDS Lond Engl*. 2011 Jan 28;25(3):325–33.
159. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, MacArthur RD, Baxter JD, et al. Low-Abundance Drug-Resistant Viral Variants in Chronically HIV-Infected, Antiretroviral

- Treatment–Naive Patients Significantly Impact Treatment Outcomes. *J Infect Dis.* 2009 Mar 1;199(5):693–701.
160. Balduin M, Oette M, Däumer MP, Hoffmann D, Pfister HJ, Kaiser R. Prevalence of minor variants of HIV strains at reverse transcriptase position 103 in therapy-naïve patients and their impact on the virological failure. *J Clin Virol.* 2009 May;45(1):34–8.
161. Nicot F, Sauné K, Raymond S, Jeanne N, Carcenac R, Lefebvre C, et al. Minority resistant HIV-1 variants and the response to first-line NNRTI therapy. *J Clin Virol.* 2015 Jan 1;62:20–4.
162. Delobel P, Saliou A, Nicot F, Dubois M, Trancart S, Tangre P, et al. Minor HIV-1 Variants with the K103N Resistance Mutation during Intermittent Efavirenz-Containing Antiretroviral Therapy and Virological Failure. Yu X, editor. *PLoS ONE.* 2011 Jun 27;6(6):e21655.
163. Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, Wantman M, et al. Low Frequency Nonnucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor–Resistant Variants Contribute to Failure of Efavirenz-Containing Regimens in Treatment-Experienced Patients. *J Infect Dis.* 2010 Jan 26;100126095936095-000.
164. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Kozal MJ, Hullsiek KH, et al. Relationship between minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations, adherence, and the risk of virologic failure: AIDS. 2012 Jan;26(2):185–92.
165. Lockman S, Hughes MD, McIntyre J, Zheng Y, Chipato T, Conradie F, et al. Antiretroviral Therapies in Women after Single-Dose Nevirapine Exposure. *N Engl J Med.* 2010 Oct 14;363(16):1499–509.
166. Boltz VF, Zheng Y, Lockman S, Hong F, Halvas EK, McIntyre J, et al. Role of low-frequency HIV-1 variants in failure of nevirapine-containing antiviral therapy in women previously exposed to single-dose nevirapine. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 May 31;108(22):9202–7.
167. Bansal V, Metzner KJ, Niederöst B, Leemann C, Böni J, Günthard HF, et al. Minority K65R Variants and Early Failure of Antiretroviral Therapy in HIV-1–infected Eritrean Immigrant. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1966.
168. Gianella S, Delport W, Pacold ME, Young JA, Choi JY, Little SJ, et al. Detection of Minority Resistance during Early HIV-1 Infection: Natural Variation and Spurious Detection rather than Transmission and Evolution of Multiple Viral Variants ▽. *J Virol.* 2011 Aug;85(16):8359–67.
169. Stekler JD, Ellis GM, Carlsson J, Eilers B, Holte S, Maenza J, et al. Prevalence and Impact of Minority Variant Drug Resistance Mutations in Primary HIV-1 Infection. *PLoS ONE.* 2011 Dec 16;6(12):e28952.
170. Codoñer FM, Pou C, Thielen A, García F, Delgado R, Dalmau D, et al. Dynamic escape of pre-existing raltegravir-resistant HIV-1 from raltegravir selection pressure. *Antiviral Res.* 2010 Dec;88(3):281–6.

171. Charpentier C, Laureillard D, Piketty C, Tisserand P, Batisse D, Karmochkine M, et al. High frequency of integrase Q148R minority variants in HIV-infected patients naive of integrase inhibitors. *AIDS Lond Engl*. 2010 Mar 27;24(6):867–73.
172. Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, Van Marck H, Cento V, D'Arrigo R, et al. Study of Genotypic and Phenotypic HIV-1 Dynamics of Integrase Mutations During Raltegravir Treatment: A Refined Analysis by Ultra-Deep 454 Pyrosequencing. *J Infect Dis*. 2012 Feb 15;205(4):557–67.
173. Ceccherini-Silberstein F, Van Baelen K, Armenia D, Trignetti M, Rondelez E, Fabeni L, et al. Secondary Integrase Resistance Mutations Found in HIV-1 Minority Quasispecies in Integrase Therapy-Naive Patients Have Little or No Effect on Susceptibility to Integrase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep 1;54(9):3938–48.
174. Liang B, Luo M, Scott-Herridge J, Semeniuk C, Mendoza M, Capina R, et al. A Comparison of Parallel Pyrosequencing and Sanger Clone-Based Sequencing and Its Impact on the Characterization of the Genetic Diversity of HIV-1. *PLoS ONE*. 2011 Oct 21;6(10).
175. Anstett K, Fusco R, Cutillas V, Mesplède T, Wainberg MA. Dolutegravir-Selected HIV-1 Containing the N155H and R263K Resistance Substitutions Does Not Acquire Additional Compensatory Mutations under Drug Pressure That Lead to Higher-Level Resistance and Increased Replicative Capacity. *J Virol*. 2015 Oct 15;89(20):10482.
176. Mesplède T, Osman N, Wares M, Quashie PK, Hassounah S, Anstett K, et al. Addition of E138K to R263K in HIV integrase increases resistance to dolutegravir, but fails to restore activity of the HIV integrase enzyme and viral replication capacity. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Oct;69(10):2733.
177. Quashie PK, Mesplède T, Han Y-S, Oliveira M, Singhroy DN, Fujiwara T, et al. Characterization of the R263K Mutation in HIV-1 Integrase That Confers Low-Level Resistance to the Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitor Dolutegravir. *J Virol*. 2012 Mar;86(5):2696.
178. Wainberg M, Anstett K, Mesplede T, Quashie P, Han Y, Oliveira M. The R263K mutation in HIV integrase that is selected by dolutegravir may actually prevent clinically relevant resistance to this compound. *J Int AIDS Soc*. 2014;17(4Suppl 3).
179. Fun A, Wensing AM, Verheyen J, Nijhuis M. Human Immunodeficiency Virus gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology*. 2012;9:63.
180. Banke S, Lillemark MR, Gerstoft J, Obel N, Jørgensen LB. Positive Selection Pressure Introduces Secondary Mutations at Gag Cleavage Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Harboring Major Protease Resistance Mutations. *J Virol*. 2009 Sep;83(17):8916.
181. Flynn WF, Chang MW, Tan Z, Oliveira G, Yuan J, Okulicz JF, et al. Deep Sequencing of Protease Inhibitor Resistant HIV Patient Isolates Reveals Patterns of Correlated Mutations in Gag and Protease. *PLoS Comput Biol*. 2015 Apr 20;11(4).

182. Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF, Costa PR, et al. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PLoS ONE*. 2012 May 4;7(5).
183. Lundin S, Stranneheim H, Pettersson E, Klevebring D, Lundeberg J. Increased Throughput by Parallelization of Library Preparation for Massive Sequencing. *PLoS ONE*. 2010;5(4).
184. Jiamsakul A, Chaiwarith R, Durier N, Sirivichayakul S, Kiertiburanakul S, Van Den Eede P, et al. Comparison of genotypic and virtual phenotypic drug resistance interpretations with laboratory-based phenotypes among CRF01_AE and subtype B HIV-infected individuals. *J Med Virol*. 2016 Feb 1;88(2):234–43.
185. Ceresola ER, Nozza S, Sampaolo M, Pignataro AR, Saita D, Ferrarese R, et al. Performance of commonly used genotypic assays and comparison with phenotypic assays of HIV-1 coreceptor tropism in acutely HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2015 May;70(5):1391.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2016/2017

Nom : DELDALLE Prénom : Joséphine

Titre du mémoire: Génotypage de résistance du VIH-1 chez les patients naïfs : apport du séquençage de l'ADN par méthode Sanger et de l'ARN par séquençage haut débit.

Mots-clés : VIH – Génotypage - Séquençage – Sanger – NGS – naïf – Protéase – RT - Intégrase – Mutations de résistance

Introduction : La méthode de référence de génotypage de résistance chez les patients VIH-1 est le séquençage de l'ARN plasmatique par méthode Sanger. Cette méthode est limitée par son incapacité à détecter les mutations de résistance ayant une prévalence inférieure à 20%. Nous avons comparé le séquençage Sanger sur ADN et le séquençage à haut débit (NGS) sur ARN à la technique de référence pour le génotypage de résistance du VIH-1 chez les patients naïfs.

Méthode : Le séquençage Sanger a été réalisé selon les recommandations de l'ANRS. Le kit « HIV-1 Drug Resistance Assay – v3 » sur le 454 GS Junior a été utilisé pour le séquençage NGS (Roche). Les mutations de résistance ont été analysées en accord avec la liste de l'IAS 2015. Les algorithmes ANRS, Rega et Standford ont été utilisés pour l'interprétation de la résistance.

Résultats : Sur 54 patients inclus dans cette étude ; le nombre de patients ayant au moins une mutation majeure est 3, 5, 5, 10 et 20 ; respectivement avec les techniques Sanger ARN, Sanger ADN, NGS 20%, NGS 5% et NGS 1%. De très nombreuses mutations mineures ont été retrouvées chez ces patients, particulièrement sur le gène de la protéase. Une bonne concordance a été retrouvée entre le séquençage Sanger ARN et ADN et le NGS 20% malgré quelques discordances. Les mutations minoritaires détectées n'ont pas eu d'impact sur l'issue à court terme du traitement antirétroviral.

Conclusion : Le séquençage Sanger de l'ADN n'améliore pas la détection des mutations associées à la résistance, contrairement au NGS. Cependant, la pertinence clinique des mutations minoritaires en NGS doit encore faire l'objet d'autres investigations.

Membres du jury :

Président : Madame le Docteur GOFFARD Anne

Assesseurs : Madame le Professeur DECOSTER Anne

Madame le Docteur BOCKET Laurence

Madame le Docteur AJANA Faïza

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur ALIDJINOU Enagnon Kazali