

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

**Soutenu publiquement le 23 octobre 2020
Par Melle MILLIERE Laurine**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de**

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

**GENOTYPAGE DE RESISTANCE DU VIH-1 DANS L'ADN PROVIRAL :
VARIABILITE DANS UN MEME PRELEVEMENT**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur GOFFARD Anne, PU-PH, Université de Lille, CHU Lille

Asseseurs : Monsieur le Professeur SENDID Boualem, PU-PH, Université de Lille, CHU Lille
Madame le Docteur BOCKET Laurence, PH, CHU Lille
Monsieur le Docteur ROBINEAU Olivier, MCU-PH, Université de Lille, CH Dron, Tourcoing

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



Faculté de Pharmacie de Lille



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

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

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

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective :	Régis BORDET
Vice-présidente ressources :	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie – Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie – Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie

M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale

M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie

Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques

M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie 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 mon président de jury,

Professeur Anne Goffard

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire de Virologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mes assesseurs,

Professeur Boualem Sendid

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef du service de Parasitologie-Mycologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Docteur Laurence Bocket

Praticien Hospitalier

Laboratoire de Virologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Sans hésitation, vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse. C'est également avec une grande bienveillance que vous m'avez accompagnée tout au long de ce semestre. Je vous remercie pour votre gentillesse, vos conseils avisés et votre soutien indéfectible. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

Docteur Olivier Robineau

Maître de conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Service Universitaire des Maladies Infectieuses et du Voyageur

Centre Hospitalier Dron de Tourcoing

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de l'intérêt que vous avez porté à ce sujet. Soyez assuré de ma plus sincère considération.

A mon directeur de thèse,

Docteur Enagnon Kazali Alidjinou

Maître de conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Laboratoire de Virologie

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail. Merci de m'avoir aussi bien encadrée, d'avoir été disponible et bienveillant quand il le fallait. Je te remercie également pour toutes les connaissances que tu m'as apportées tout au long de ce stage et de ce projet. Je n'aurai pas pu rêver mieux que toi pour diriger ma thèse. Sois assuré de mes plus sincères remerciements et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier,

Toute l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Lille. Un immense merci pour votre accueil et votre bonne humeur.

Une pensée particulière, pour l'équipe technique de la plateforme de séquençage : Nathalie, Fanny, Valérie, Manu ainsi que Christophe. Je vous remercie infiniment pour votre implication pour la réalisation des séries de séquençage, votre disponibilité et vos conseils qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Aux biologistes, pour le partage de toutes vos connaissances autant sur le plan humain que professionnel. Pour cette expérience intense mais enrichissante à vos côtés, sans oublier nos instants décompression à l'heure du fameux « Tea Time ».

Claire, je te remercie pour tes précieux conseils à chaque étape de ma vie d'interne, d'Amiens à Lille en passant par Beauvais. Merci pour ta générosité, pour toutes tes petites attentions, pour ces bons moments passés ensemble, et pour nos pauses thé devenues des pauses café.

Youssef, mon « binôme », pour le meilleur et pour le pire ! Merci pour ton écoute, ta patience et surtout pour avoir supporté mon stress quotidien ces dernières semaines voire ces derniers mois.

Toute l'équipe du laboratoire du CHU d'Amiens, pour ces deux années où j'ai tant appris et découvert ma vocation pour la microbiologie. Jean-Marc, pour ton oreille attentive, tes conseils et pour ton travail sur ma confiance en moi, promis j'ai progressé depuis !

Toute l'équipe du laboratoire du CH de Beauvais, pour m'avoir accueilli telle une grande famille. A Claire P., pour toutes les connaissances que tu m'as transmises.

Toute l'équipe de l'IHU de Marseille, aux biologistes, et plus particulièrement à Claudia et à l'équipe de génomique pour m'avoir soutenue dans mes projets parfois jusqu'au bout de la nuit.

Et enfin, toute l'équipe du laboratoire de Valenciennes. Merci pour votre accueil chaleureux, votre formation, et pour m'avoir permis de pouvoir écrire ce travail dans les meilleures conditions.

Je souhaite dédier ce travail,

A mes amis et co-internes,

Ceux d'Amiens, Sophie, Amandine et Quentin, mes supers « colocs de l'enfer », à tous ces moments qu'on a pu partager à l'internat puis dans notre coloc. Ils ont été le point de départ d'une grande amitié. Je suis très heureuse de vous avoir à mes côtés, et je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

A mes co-internes, Cédric, Mathilde, Julie, Manon, Geoffrey, Baptiste, et Ben. Merci d'avoir fait de mes deux premières années d'internat (et 1/2 !) de très bons souvenirs.

A l'AG Team, Marine et Amandine, merci pour cette belle amitié et pour tous ces moments de grand n'importe quoi.

Ceux de Marseille, à la team bactério, ainsi qu'à Maëlia, Sara et Camille. Je retiendrai votre cohésion et votre soutien dans les moments compliqués, nos nombreux fou rires, ainsi que nos pauses cafés post-staff au niveau du « micro-climat » de l'IHU. Merci de m'avoir si facilement intégrée.

Ceux de Lille, rencontrés au cours de cette dernière année, vous avez su m'accueillir avec la chaleur du Nord et je vous en remercie. Une petite dédicace à l'équipe de microbiologie : Pauline, Alice, Ambroise, Mickaël et Mahdi pour toutes ces heures passées ensemble.

Une pensée pour Pauline, Gatien et Maël, ainsi qu'à la *team* Internium, je suis prête à relever le défi et à organiser une grande « fête » à vos côtés !

A tous les autres Lillois que je n'ai pas pu citer, sans oublier Alexis.

A mes amis,

A mes copines de toujours, Aline, Andréa et Elodie. Ainsi qu'au reste de la clique des meilleurs Ougeois : Anne-Laure, Audrey, Mainro, Matthieu, Ludo, Goonies, Clément, Baptiste, Alexis et Monk. Malgré la distance et le temps qui passe, nos retrouvailles sont toujours aussi attendues.

A mes amis « lycée », Adeline, pour ton amitié si précieuse, et à la *team* « S » pour ces supers moments partagés ensemble.

A la *team* Pharma Dijon, en particulier à la *team* internat : Clémence, Laura, Rozé, Rémi, Maxence, ainsi que Macou, Margaux, Anaïs, Anne-France, Orane, Clarisse, Prissou, Nino, Jessaume, Fredj, Jacob, Mounier et Bibiche. Vous avez su rendre ces 5 années de pharma inoubliables. Je suis toujours aussi contente de vous retrouver à l'occasion d'un week-end aux quatre coins de la France ou tout simplement en terres bourguignonnes.

A la coloc Marseillaise, Laura, Nabil, Jacques et Nico, pour m'avoir considérée comme votre 5^{ème} coloc. Merci pour ces 6 mois inoubliables et ces soirées mémorables. Bref, « il vaut mieux maintenant que dans 2h ».

A mon comité de relecture : Lison, Aline, Quentin, Maxence et Sophie. Merci !

A ma famille,

A mes parents,

Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir, si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, vos encouragements et votre amour. Je suis fière d'avoir des parents comme vous. Merci pour tout.

A mes grands-parents et toute ma famille,

Vous êtes chers à mon cœur. Merci à tous pour votre soutien pendant ces années d'étude.

A Nathan, mon petit frère, merci pour ta bienveillance et tes encouragements. Alysson, merci de faire partie de notre famille.

A Lison, ma petite sœur, ma confidente. Je te remercie pour ton aide si précieuse, ainsi que pour tes conseils et tes avis bien tranchés qui me permettent chaque jours d'avancer.

Merci pour à tous les deux pour cette belle complicité. Je suis tellement fière de vous.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	13
LISTE DES ABREVIATIONS	25
INTRODUCTION	29
PARTIE I : GENERALITES	31
1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)	31
1.1. <i>Découverte, origine et taxonomie du VIH</i>	31
1.1.1. Découverte du VIH.....	31
1.1.2. Origine, classification et évolution génétique du VIH.....	31
1.2. <i>Structure du VIH et organisation génomique</i>	33
1.2.1. Structure des particules virales.....	33
1.2.2. Génome viral	34
1.3. <i>Multiplication du virus</i>	35
1.3.1. Cellules cibles.....	35
1.3.2. Cycle de multiplication.....	36
• Adsorption et pénétration du virus :	37
• Décapsidation et transcription inverse	37
• Import nucléaire et intégration.....	37
• Transcription et synthèse des protéines virales.....	37
• Assemblage et production de particules virales.....	38
1.3.3. Facteurs de restriction cellulaire	38
2. L'INFECTION A VIH	39
2.1. <i>Épidémiologie</i>	39
2.1.1. A l'échelle mondiale	39
2.1.2. Situation en Europe.....	39
2.1.3. Situation en France.....	40
2.2. <i>Histoire naturelle de l'infection par le VIH</i>	40
2.2.1. Primo-infection.....	41
2.2.2. Phase cliniquement asymptomatique.....	42
2.2.3. Stade SIDA.....	42
2.3. <i>Diagnostic et traitement de l'infection par le VIH</i>	42
2.3.1. Diagnostic biologique de l'infection par le VIH	42
2.3.1.1. Cinétique des marqueurs biologiques de l'infection par le VIH	43
2.3.1.2. Stratégie du diagnostic biologique	43
2.3.2. Traitement de l'infection par le VIH-1	45
2.3.2.1. Principes et objectifs du traitement antirétroviral.....	45
2.3.2.2. Différentes classes d'antirétroviraux	46
• Les inhibiteurs de la transcriptase inverse :	46
• Les inhibiteurs de l'intégrase (INI) :	47
• Inhibiteurs de protéase (IP) :	47
• Les inhibiteurs d'entrée :	47

• Schémas thérapeutiques et recommandations :.....	48
2.3.2.3. Suivi virologique.....	48
• Mesure de la charge virale.....	48
• Étude de la résistance aux antirétroviraux	49
• Quantification de l'ADN proviral :.....	50
3. GENOTYPAGE DE RESISTANCE DU VIH-1	50
3.1. <i>Indications</i>	50
3.2. <i>Tests génotypiques de résistance</i>	50
3.2.1. Séquençage Sanger	51
3.2.2. Séquençage de nouvelle génération (NGS, en anglais).....	52
3.2.2.1. La technologie Ion Torrent®	52
3.2.2.2. La technologie Illumina ®.....	53
3.2.3. Principales mutations associées à des résistances aux antirétroviraux.....	54
3.2.3.1. Résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	54
• Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI).....	54
• Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	55
3.2.3.2. Résistances aux inhibiteurs de la protéase	55
3.2.3.3. Résistances aux inhibiteurs de l'intégrase.....	55
3.2.3.4. Résistances aux inhibiteurs de fusion	56
3.2.3.5. Résistances aux inhibiteurs aux anti-CCR5.....	56
3.2.4. Outils d'interprétation des mutations de résistance.....	56
4. LE RESERVOIR DU VIH.....	57
4.1. <i>Description du réservoir du VIH-1</i>	57
4.1.1. Réservoirs cellulaires	57
4.1.2. Réservoirs tissulaires	58
4.1.3. Les différentes formes d'ADN VIH-1 associées aux cellules.....	60
4.2. <i>Mécanisme de persistance du VIH-1</i>	61
4.3. <i>Quantification du réservoir et intérêt clinique</i>	62
4.3.1. Les méthodes de quantification du réservoir	62
4.3.2. Réservoir et histoire naturelle de l'infection à VIH-1.....	63
4.3.3. La quantification du réservoir comme marqueur pronostique	64
4.4. <i>Génotypage sur ADN VIH-1 et intérêt clinique</i>	65
PARTIE II : ÉTUDE	69
1. OBJECTIFS DU TRAVAIL	69
2. MATERIELS ET METHODES	71
2.1. <i>Patients et échantillons</i>	71
2.2. <i>Extraction des acides nucléiques cellulaires et quantification de l'ADN total</i>	71
2.2.1. Extraction des acides nucléiques.....	71
2.2.2. Quantification de l'ADN total.....	72
2.2.3. Quantification par PCR en temps réel de l'ADN VIH-1.....	72
2.3. <i>Séquençage de l'ADN VIH-1</i>	74
2.3.1. PCR : Préparation et amplification	75
2.3.1. Préparation de la librairie.....	76
2.3.2. Préparation de la matrice de séquençage par amplification clonale.....	77
2.3.2.1. PCR Émulsion	77

2.3.2.2.	Enrichissement par isolement des billes ISP	78
2.3.3.	Réaction de séquençage.....	78
2.3.3.1.	Chargement de la puce.....	78
2.3.3.2.	Séquençage sur PGM Ion Torrent	79
2.3.4.	Analyse des données et contrôle de qualité	79
2.4.	<i>Identification des mutations et interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux</i>	80
2.5.	<i>Analyse phylogénétique</i>	80
2.6.	<i>Analyse statistique</i>	80
3.	RESULTATS	81
3.1.	<i>Patients et échantillons</i>	81
3.2.	<i>Évaluation de la charge virale en ADN VIH-1 total</i>	83
3.2.1.	Quantification de l'ADN total au Nanodrop	83
3.2.2.	Quantification par RT-PCR de l'ADN VIH-1	83
3.3.	<i>Séquences</i>	84
3.4.	<i>Mutations de résistance</i>	86
3.4.1.	Identification des mutations de résistance à 20%	86
3.4.2.	Interprétation des mutations de résistance à 20%	90
3.4.3.	Identification des mutations de résistance au seuil de 10%.....	104
3.1.	<i>Comparaison de l'historique de génotypages sur ARN plasmatique au résultat du génotypage sur ADN</i>	108
3.2.	<i>Analyse phylogénétique moléculaire</i>	112
3.2.1.	Au niveau du gène de la protéase.....	113
3.2.2.	Au niveau du gène de la transcriptase inverse	114
3.2.3.	Au niveau du gène de l'intégrase.....	115
4.	DISCUSSION	117
5.	CONCLUSION	123
	ANNEXES	125
	BIBLIOGRAPHIE	135

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les différents poids moléculaires des protéines structurales du VIH-1 sont indiqués en bleu, et du VIH-2 en rouge sur la figure (5).	34
Figure 2 : Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1 et du VIH-2 intégré dans le génome cellulaire (9).	35
Figure 3 : Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1 (9).	36
Figure 4 : Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1 au cours de temps (9).	41
Figure 5 : Cinétique schématique des marqueurs virologiques de la primo-infection VIH en l'absence de traitement (31).	43
Figure 6 : Stratégie de dépistage de l'infection par le VIH, adulte et enfant > 18 mois (33).	44
Figure 7 : Principe du séquençage Sanger (52).	51
Figure 8 : Principe du séquençage haut débit sur l'analyseur PGM Ion Torrent (56).	53
Figure 9 : Principe du séquençage haut débit de la plateforme Illumina (56).	54
Figure 10 : Capacité proliférative et durée de vie des sous populations LT CD4+ (51).	58
Figure 11 : Tissus et organes contribuant au réservoir du VIH-1 : L'intensité de coloration est fonction du degré d'infection de chaque site (52).	59
Figure 12 : Les différentes formes d'ADN du VIH-1 (63).	60
Figure 13 : Les différentes formes intégrées et non intégrées d'ADN VIH-1 (59).	61
Figure 14 : Flux de travail général du séquençage haut débit.	74
Figure 15 : Régions ciblées du génome du VIH-1.	76
Figure 16 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de la protéase du VIH-1.	113
Figure 17 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de la TI du VIH-1.	114
Figure 18 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de l'intégrase du VIH-1.	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification.....	73
Tableau 2 : Conditions d'amplification pour la réaction de RT-PCR.....	73
Tableau 3 : Programme PCR embarqué sur Thermocycleur VERITI DX.	75
Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification clonale.	77
Tableau 5 : Caractéristiques des patients.	82
Tableau 6 : Quantification de l'ADN total en ng/ μ L (ou μ g/mL).....	83
Tableau 7 : Quantification par RT-PCR de l'ADN VIH-1 en copies/ 10^6 cellules.	84
Tableau 8 : Nombre total de reads des séquences analysées.....	85
Tableau 9 : Couverture médiane des séquences analysées.....	86
Tableau 10 : Mutations observées	87
Tableau 11 : Interprétation des mutations de résistance.....	92
Tableau 12 : Nouvelles mutations observées.....	105
Tableau 13 : Données cumulées des précédents résultats de génotypage sur ARN plasmatique, résultat génotypage sur ADN aux seuils de 20% et 10%.	109

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	Abacavir
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Ag	Antigène
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like 3G
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARV	AntiRétroViraux
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATV	Atazanavir
BIC	Bictegravir
BID	<i>Bis In Die</i> (du latin, deux fois par jour)
CAB	Cabotegravir
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CE	Conformité Européenne
CH	Centre Hospitalier
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CRF	<i>Circulating Recombinant Forms</i> (formes recombinantes circulantes)
CV	Coefficient de variation
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
ddNTP	Didéoxynucléotides triphosphates
dNTP	Déoxynucléotides triphosphates
DOR	Doravirine

DRV	Darunavir
DTG	Dolutégravir
EACS	<i>European AIDS Clinical Society</i>
EDTA	<i>Éthylènediaminetétraacétique</i>
EFV	Efavirenz
ELISA	ELISA : <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ETR	Etravirine
EVG	Elvitégravir
FTC	Emtricitabine
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tissu lymphoïde associé au tube digestif)
Gp	Glycoprotéine
HAS	Haute Autorité de Santé
HR1	<i>Heptad repeat 1</i>
IB	<i>Immunoblot</i>
IC	Contrôle interne
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IF	Inhibiteurs de fusion
INI	Inhibiteurs de l'intégrase
INNTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteurs de protéase
IQR	Interquartile
ISP	Ion Sphere Particule
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPV	Lopinavir
LT	Lymphocyte T

LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
miARNs	microARNs
MVC	Celsentri
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (séquençage de nouvelle génération)
NVP	Névirapine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	Programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida
Pb	Paire de bases
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
pH	potentiel Hydrogène
PNH	Primates non humains
PrEP	Prophylaxie Pré-Exposition
QD	<i>Quaque Die</i> (du latin, une fois par jour)
RAL	Raltégravir
RT	Reverse transcriptase (TI : Transcriptase inverse)
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR (Transcriptase inverse – PCR)
RTV	Ritonavir
RPV	Rilpivirine
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>
SERINC3/C5	<i>Serine incorporator 3/5</i>
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Viruses</i> (Virus d'immunodéficience simienne)
SNC	Système Nerveux Central
SQV	Saquinavir
TAF	Alafenamide

TAM	<i>Thymidine Analog Mutations</i>
TasP	<i>Treatment as Prevention</i>
TCM	<i>Central memory T-cell</i> (Lymphocytes mémoires centraux)
TDF	Ténofovir
TEM	<i>Effector memory T-cell</i> (Lymphocytes mémoires effecteurs)
Tfh	Lymphocytes folliculaires auxiliaires
TI	Transcriptase Inverse
TN	Cellules T CD4 naïves
TPV	Tipranavir
TRIM5 α	<i>Tripartite motif-containing protein 5</i>
TROD	Test Rapide d'Orientation Diagnostique
TSCM	<i>Stem cell memory T-cell</i> (Cellules souches mémoires T)
TTM	<i>Transitional memory T-cell</i> (Lymphocytes mémoires transitionnels)
T-20	Enfuvirtide
UDG	<i>Uracil-DNA glycosylase</i>
URF	<i>Unique recombinant forms</i> (Formes recombinantes uniques)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WB	<i>Western blot</i>
ZDV	Zidovudine
3TC	Lamivudine

INTRODUCTION

Plus de trente ans après la découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la pandémie liée à ce virus reste l'une des plus importantes qu'a connu le système sanitaire mondial. Aujourd'hui, 38 millions de personnes sont infectées par le VIH et plus de la moitié (53%) des cas vivent en Afrique subsaharienne. En 2019, le nombre de décès liés au VIH était de 690 000 personnes et le nombre de nouvelles infections était de 1,7 millions (1). Pourtant, la prise en charge de l'infection a connu des avancées significatives avec la disponibilité actuelle de moyens modernes de diagnostic et de suivi, ainsi que des molécules robustes, mieux tolérées qui permettent un contrôle efficace de la réplication virale. Le triple objectif (90-90-90) de l'ONUSIDA pour 2020 se déclinait d'ailleurs comme suit : « A l'horizon 2020 : 90% des personnes vivant avec le VIH doivent connaître leur statut sérologique, 90% des personnes infectées par le VIH dépistées doivent recevoir un traitement antirétroviral (ARV) durable et 90% des personnes recevant un traitement ARV doivent avoir une charge virale durablement supprimée ».

Malgré les succès obtenus dans la prise en charge, l'obstacle majeur à la guérison de l'infection à VIH reste l'existence d'un réservoir. En effet, la persistance du virus sous forme d'ADN intégré (provirus) dans le génome des cellules réservoirs est à l'origine d'un rebond virologique à l'arrêt du traitement. L'estimation de ce réservoir notamment par la quantification de l'ADN VIH dans les cellules, fournit un marqueur pronostique utile quant à l'évolution immuno-virologique de l'infection.

La pression de sélection des ARV associée à différents facteurs comme le taux de mutations induites par la transcriptase inverse, le taux de recombinaisons génétiques et la production virale peut conduire à l'émergence de résistance aux traitements.

Actuellement, la prescription d'un traitement ARV doit donc être guidée par des tests de résistance aux ARV. Il s'agit en routine d'un test génotypique sur ARN VIH-1 plasmatique, par séquençage des gènes cibles des molécules que sont les gènes de la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase, avec recherche de mutations décrites comme associées à la résistance. Ce test est réalisé habituellement avant la prescription d'une première ligne de traitement chez un patient naïf ou avant un changement de thérapie suite à un échec virologique chez un patient traité.

Cependant, dans certaines circonstances où le test génotypique sur l'ARN plasmatique n'est pas possible comme par exemple pour les patients ayant une

charge virale indétectable et candidats à un changement de traitement, le test génotypique sur ADN cellulaire peut être utile. Le génotypage de résistance sur ADN VIH cellulaire a été évalué par plusieurs études et est apparu comme une alternative intéressante en l'absence de génotype ARN, ou un complément utile à ce dernier dans d'autres circonstances. L'intérêt de ce test en pratique clinique fait néanmoins encore l'objet de controverses notamment à cause parfois d'un défaut de sensibilité et/ou de spécificité, en comparaison au test génotypique sur ARN.

Le présent travail s'inscrit dans une démarche de meilleure compréhension des résultats obtenus avec le génotypage sur ADN, dans le but de pouvoir proposer une optimisation dans l'usage de ce test en routine.

Partie I : Généralités

1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

1.1. Découverte, origine et taxonomie du VIH

1.1.1. Découverte du VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été découvert en 1983 par l'équipe française des Professeurs Barré-Sinoussi et Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris. Ils ont reçu en 2008 le prix Nobel de Médecine pour l'identification de ce nouveau rétrovirus à partir d'une biopsie de ganglion lymphatique chez un patient présentant une lymphoadénopathie généralisée (2). La description dès 1981 d'une épidémie de pneumonies à *Pneumocystis* d'origine communautaire chez des patients homosexuels auparavant en bonne santé, associée à une altération profonde du système immunitaire, a en effet permis de mettre en évidence un nouveau syndrome : le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). L'agent étiologique fut tout d'abord nommé « Lymphadenopathy associated virus » (LAV) puis virus de l'immunodéficience humaine (3).

En 1986, le VIH de type 2 (VIH-2) un nouveau virus apparenté au premier mais très divergeant a été décrit chez des patients d'Afrique de l'Ouest (4).

1.1.2. Origine, classification et évolution génétique du VIH

Les VIH appartiennent à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* qui comporte actuellement 6 genres. Les VIH font partie du genre *Lentivirus*. Les lentivirus sont responsables de pathologies majeures chez les mammifères et sont caractérisés par des maladies à développement lent (5).

Les VIH sont apparentés à d'autres lentivirus isolés chez plus de 45 espèces de primates non humains (PNH), regroupés sous la dénomination de SIV pour « Simian immunodeficiency viruses ». Le SIVcpz isolé chez les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) et le SIVgor retrouvé chez les gorilles (*Gorilla gorilla gorilla*) d'Afrique centrale sont proches du VIH-1. En revanche, les SIVsmm détectés chez les mangabés enfumés (*Cercocebusatys*) d'Afrique de l'Ouest sont, quant à eux, plus proches du VIH-2. Les différentes analyses phylogénétiques ont mis en évidence

une transmission inter-espèce du singe à l'homme. Le mode de transmission n'est pas encore clairement défini, mais l'homme se serait probablement contaminé au contact de sang de singe pendant la chasse. A ce jour, plus de douze transmissions zoonotiques ont été répertoriées permettant de décrire quatre groupes pour le VIH-1 et neuf pour le VIH-2.

Parmi les groupes du VIH-1, on distingue un groupe majoritaire : le groupe M (pour major), et trois autres groupes minoritaires : le groupe O (pour outlier), le groupe N (pour non-M/non O) et le groupe P. Le groupe M est responsable de la pandémie et est divisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) (6,7). Le sous-type B est à l'origine de la pandémie en Europe et aux États-Unis. Les autres sous-types proviennent majoritairement d'Afrique. En France, le VIH-1 de groupe O ne concerne qu'une centaine de personnes principalement originaires du Cameroun, le VIH-1 de groupe N une dizaine, et le VIH-1 de groupe P deux individus (5,6). Actuellement, plus de 102 recombinaisons circulantes (CRF) issues de la recombinaison entre deux ou plusieurs sous types du VIH groupe M ont été décrites dans la classification et de nombreuses recombinaisons uniques (URF) (www.hiv.lanl.gov). Le CRF01-AE et le CRF02-AG sont respectivement à l'origine d'épidémie en Asie et en Afrique de l'Ouest (8). Parmi les 9 lignées distinctes du VIH-2 (A à I), seuls les groupes A et B sont épidémiques.

La variabilité génétique du VIH est liée à différents facteurs : la faible fidélité de la transcriptase inverse (taux de mutation à 1 pour 10 000 ou 100 000 bases) ; la vitesse de réplication élevée du virus (plus de 10 milliards de virus serait produit chaque jour) et les phénomènes de recombinaison génétique. Au cours de la primo-infection VIH, la population virale chez un individu est très homogène, puis chaque virus va subir des modifications génétiques indépendamment les uns des autres pour aboutir progressivement à une population hétérogène. Ainsi, plusieurs variants différents circulent chez une même personne, on parle de quasi-espèce virale. On estime à 1% le taux de mutation pour le gène *env* et à 0,5% pour le gène *gag* chaque année. Cette diversité va augmenter la difficulté à l'élaboration d'un vaccin et être à l'origine de nouvelles résistances aux antirétroviraux (5).

1.2. Structure du VIH et organisation génomique

Les rétrovirus sont caractérisés par des particules virales possédant un génome à ARN monocaténaire et une transcriptase inverse. Ils sont définis par leur mode de réplication : le génome composé de deux molécules d'ARN simple brin est transcrit en ADN double brin par une enzyme caractéristique de cette famille : la transcriptase inverse. L'ADN viral s'intègre ensuite dans le génome de la cellule hôte sous la forme d'ADN proviral. L'enveloppe est constituée par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire de la cellule hôte (5).

1.2.1. Structure des particules virales

Les VIH se présentent sous forme de particules sphériques variant de 90 à 120 nm de diamètre. Ce sont des virus enveloppés possédant une bicouche lipidique originaire de la cellule infectée, et qui est hérissée de spicules. Chaque spicule est composée d'une glycoprotéine de surface, la gp120 et d'une glycoprotéine transmembranaire, la gp41 qui s'assemblent en trimères. La face interne de l'enveloppe est tapissée par une matrice protéique composée de la protéine p17.

La capside virale, en forme de cône tronqué, est composée de la protéine interne très abondante p24. Elle contient le génome viral : deux molécules d'acide ribonucléique (ARN) identiques linéaires de polarité positive associées à la nucléocapside composée de la protéine p7. La capside contient également les trois enzymes virales : la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase), l'intégrase et la protéase. La structure du VIH-2 est identique à celle du VIH-1, mais les poids moléculaires des protéines et enzymes sont différents (Figure 1) (9).

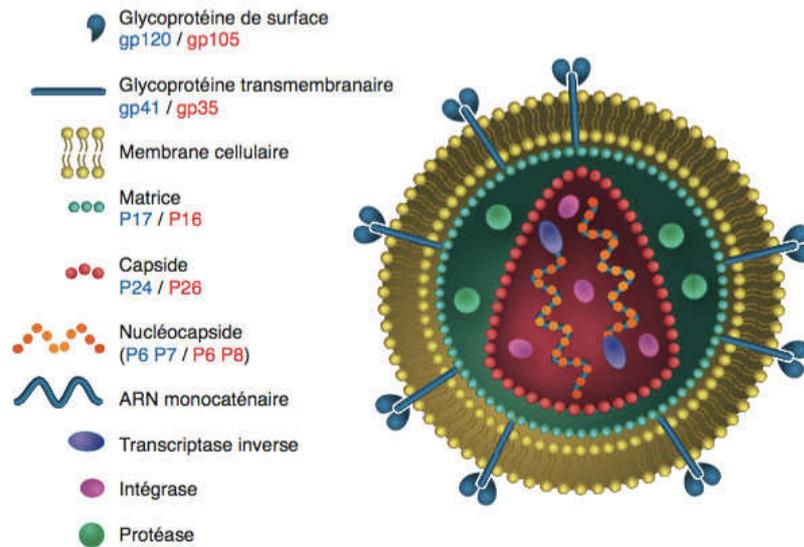


Figure 1 : Structure des virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les différents poids moléculaires des protéines structurales du VIH-1 sont indiqués en bleu, et du VIH-2 en rouge sur la figure (5).

1.2.2. Génome viral

Le génome des VIH a une longueur d'environ 9200 nucléotides. Dans le sens 5' vers 3', il contient trois gènes de structures, communs à tous les rétrovirus, codant pour des protéines de structures: *gag*, *pol* et *env* (Figure 2) :

- Le gène *gag* (*group specific antigen*) code pour les protéines internes : protéines de la nucléocapside, de la capside et de la matrice.
- Le gène *pol* (*polymerase*) code pour les trois enzymes virales : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.
- Le gène *env* (*enveloppe*) code pour le précurseur glycoprotéique gp160. La gp160 est oligomérisée dans le réticulum endoplasmique puis glycosylée dans l'appareil de Golgi. Elle est ensuite clivée par des protéases cellulaires en une glycoprotéine de surface la gp120 et une glycoprotéine transmembranaire la gp41 (10).

Il possède également 6 gènes accessoires qui codent des protéines qui régulent notamment la multiplication virale : *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* (communs aux 2 VIH), *vpu* (uniquement chez le VIH-1) et *vpx* (uniquement chez le VIH-2) (5,10).

Lorsque le génome viral est sous forme d'ADN (ou provirus), les régions codantes sont encadrées aux 2 extrémités par des régions appelées *long terminal repeat* (*LTR*). Ces séquences répétées permettent l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte et sa transcription (9).

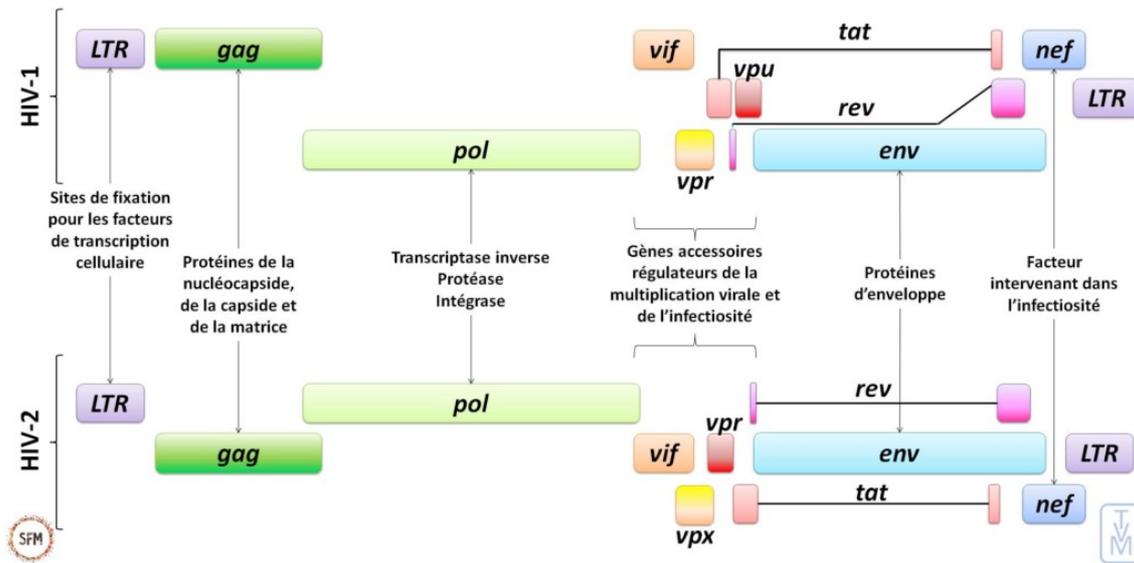


Figure 2 : Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1 et du VIH-2 intégré dans le génome cellulaire (9).

1.3. Multiplication du virus

1.3.1. Cellules cibles

Les cibles cellulaires privilégiées du VIH sont les lymphocytes T CD4+. D'autres cellules expriment le récepteur CD4 à leur surface, ce sont les cellules présentatrices d'antigènes incluant les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les cellules microgliales du système nerveux central (SNC) (11). La plupart de ces cellules sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes, tels que les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes des muqueuses comprenant le tractus gastro-intestinal (12).

Les cellules dendritiques semblent avoir un rôle non négligeable dans la transmission du VIH-1 aux lymphocytes T CD4+. Lors d'une primo-infection, grâce à leur molécule de surface (DC-SIGN), elles sont capables de capturer le virus présent au niveau des muqueuses (site d'entrée), de migrer jusqu'aux lymphocytes T CD4+ et de favoriser leurs infections (11).

A côté du récepteur principal, un corécepteur est nécessaire à l'entrée du VIH dans la cellule hôte. Parmi les corécepteurs identifiés, deux semblent majoritairement utilisés : CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) et CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*). Différents types de virus ont été définis en fonction de leur capacité à utiliser ce corécepteur : les virus R5 (virus à corécepteur CCR5), qui

sont des virus à tropisme macrophagique prédominant ; et représentent 90% des contaminations par le VIH, les virus X4 (corécepteur CXCR4), à tropisme lymphocytaire T et les virus à double tropisme X4/R5 (10).

Lors de la primo-infection les souches virales sont généralement des souches R5. Au cours de l'évolution de la maladie notamment au stade SIDA, les souches X4 et X4/R5 plus virulentes vont émerger chez environ 50% des patients (13,14).

1.3.2. Cycle de multiplication

Le cycle de multiplication du VIH-1 peut se diviser en deux parties, la première permettant l'intégration du virus dans le génome cellulaire puis la deuxième aboutissant à la libération de nouvelles particules virales. Chacune de ses étapes peut être une cible potentielle d'un traitement antirétroviral. Elles sont représentées dans la figure 3.

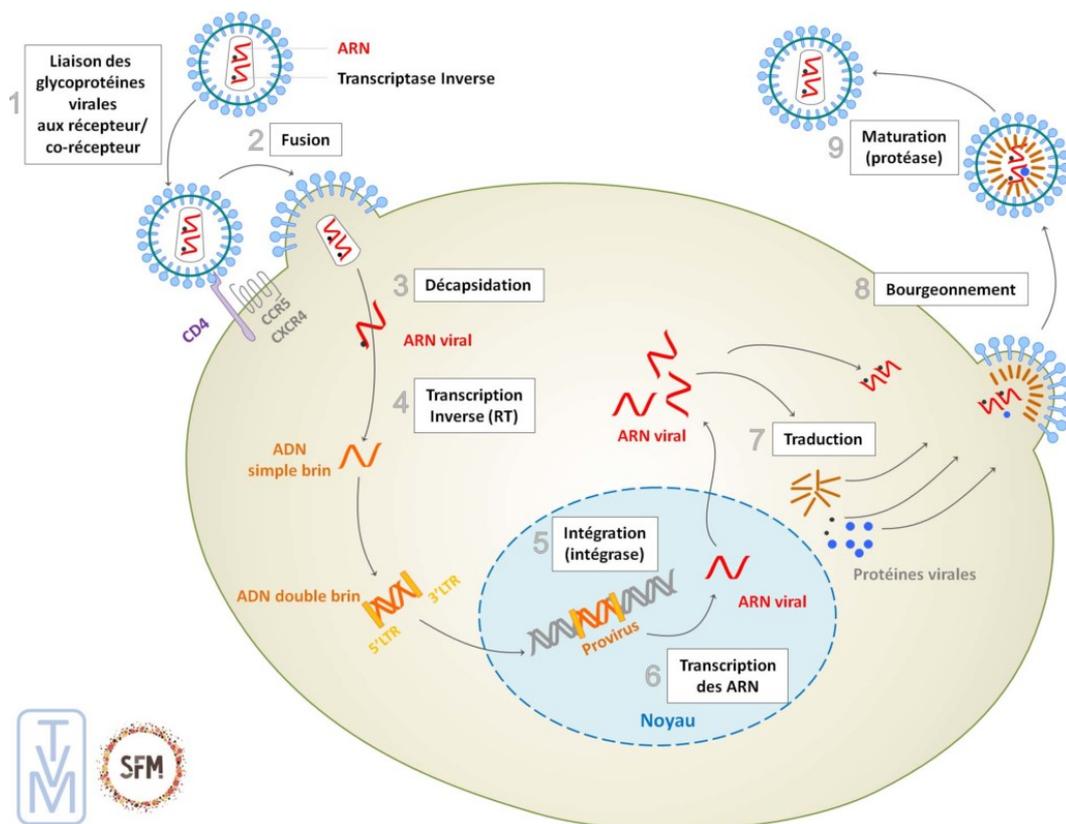


Figure 3 : Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1 (9).

- **Adsorption et pénétration du virus :**

Le processus d'entrée du VIH comprend l'adhésion du virus à la cellule hôte, la fusion des membranes cellulaires et virales ainsi que le passage du core viral dans le cytoplasme de la cellule. La glycoprotéine de surface gp120 reconnaît spécifiquement les sites récepteurs CD4+ de la cellule hôte. Cette interaction déclenche un changement structurel au sein de la gp120. Le repositionnement de la boucle variable V3 permet l'exposition du site de liaison de la gp120 aux principaux corécepteurs cellulaires : CXCR4 et CCR5.

La liaison au corécepteur conduit à un changement conformationnel de la glycoprotéine transmembranaire gp41 permettant au peptide de fusion de s'ancrer dans la membrane cellulaire. Une fois les deux membranes attachées, la gp41 se replie, amenant ainsi les membranes opposées à se rapprocher. La capsid virale est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte grâce à la formation d'un pore de fusion membranaire (15,16).

- **Décapsidation et transcription inverse**

Dans le cytoplasme de la cellule, la transcription inverse a lieu de façon concomitante à la décapsidation du virus. La transcriptase inverse virale par sa fonction ADN polymérase ARN-dépendante, va synthétiser un brin d'ADN complémentaire à l'ARN viral, avec formation d'un hybride ARN/ADNc. Le brin d'ARN viral est dégradé par l'activité RNase H de cette même enzyme. L'ADN monocaténaire obtenu est ensuite copié grâce à l'activité ADN polymérase ADN-dépendante de la TI pour former un ADN bicaténaire (9).

- **Import nucléaire et intégration**

Le double brin d'ADN viral passe dans le noyau de la cellule et s'intègre au génome humain, par l'intermédiaire de l'intégrase du VIH (5,17). Après avoir clivé le génome de la cellule hôte, cette enzyme va cliver quelques nucléotides aux extrémités du LTR du génome viral et ainsi permettre l'insertion de façon stable de l'ADN viral en liquant ces LTRs au génome cellulaire (9).

- **Transcription et synthèse des protéines virales**

Dans le noyau cellulaire, la transcription est initiée par la fixation de l'ARN polymérase ADN dépendante II cellulaire au niveau du promoteur localisé dans le

LTR en 5' du génome proviral. Une fois dans le cytoplasme, l'ARN messager (ARNm) va être épissé en différents ARNm viraux de tailles distinctes. Les premiers ARNm transcrits multiépissés vont être traduits en protéines régulatrices, en particulier *tat*, *rev* et *nef*. Puis, apparaissent les ARNm non épissés codant pour les protéines de structure *gag* et *gag-pol* ou pour le génome viral, et les ARNm partiellement épissés codant pour les protéines *env*, *vif*, *vpr* et *vpu*. La protéine *rev* favorise le transport des ARNm codant pour les protéines de structure vers le cytoplasme (5,17).

- **Assemblage et production de particules virales**

Suite à la synthèse des protéines virales, l'ARN viral subit une encapsidation puis une dimérisation. Les virions sont ensuite libérés dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement, étape durant laquelle ils acquièrent leurs glycoprotéines d'enveloppe. Les particules virales encore immatures vont devenir infectieuses par action de la protéase virale (17).

1.3.3. Facteurs de restriction cellulaire

Les facteurs de restriction cellulaire constituent une immunité intrinsèque contre le virus du VIH. Ce sont des protéines cellulaires susceptibles de limiter la multiplication de ce virus après son entrée dans la cellule hôte.

Les principaux facteurs de restriction anti-VIH identifiés à ce jour sont :

- **APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like 3G) :** une fois incorporée dans les virions, cette enzyme, une cytidine désaminase, peut provoquer une hypermutation de l'ADN lors de l'étape de transcription inverse. Les provirus mutés instables sont incapables de produire de nouveaux virus infectieux. L'activité de ces facteurs APOBEC3G peut être neutralisée par la protéine de régulation *Vif* du VIH.
- **TRIM5 α (tripartite motif-containing protein 5) :** cette protéine agit dès le début du cycle de réplication par désagrégation de la capsid virale conduisant inévitablement à un échec précoce de la transcription inverse.

- **La protéine tétherine** : elle inhibe le bourgeonnement des nouvelles particules virales provoquant l'agrégation de celles-ci à la surface de la cellule hôte. Le VIH-1 va antagoniser l'action de la tétherine par l'intermédiaire de la protéine *Vpu*.
- **SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1)** : cette enzyme : déoxynucléotide triphosphohydrolase, hydrolyse les déoxynucléotides triphosphates (dNTP) dans les cellules empêchant ainsi l'étape de transcription inverse du VIH. Les lentivirus parviennent à contrarier l'action de la SAMHD1 par l'intermédiaire des protéines *Vpx* ou *Vpr* (17).
- **SERINC3 et SERINC5 (serine incorporator)** : cette protéine lorsqu'elle est incorporée dans le virion va diminuer sa capacité infectieuse. Son activité peut être inhibée par l'intermédiaire de la protéine Nef du VIH (9).

2. L'infection à VIH

2.1. Épidémiologie

2.1.1. A l'échelle mondiale

En 1995, l'OMS estimait à 20 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde. Le nombre de personnes touchées en 2019 est estimé à 38,0 [31,6 - 44,5] millions. Cette augmentation se justifie en partie par l'allongement du taux de survie grâce à un accès facilité à la thérapie antirétrovirale. Parmi les personnes infectées par le VIH, 7,1 millions l'ignorent. En 2019, environ 1,7 [1,2 - 2,2] millions de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH. Le nombre de personnes décédées de maladies liées au SIDA s'élève à 690 000 [500 000 – 970 000], soit une baisse de 39% par rapport à 2010 (1).

L'épidémie n'épargne aucune région du monde, toutefois son ampleur varie considérablement d'une région à une autre. Les continents les plus touchés sont l'Afrique subsaharienne, abritant 53% des personnes vivant avec le VIH dans le monde, et l'Asie (18).

2.1.2. Situation en Europe

La situation dans la région Européenne de l'OMS (53 pays) reste un véritable problème de santé publique avec plus de 2 millions de personnes touchées par le

VIH. Elle témoigne d'une grande diversité avec un faible niveau d'épidémie en Europe Centrale, contrairement à l'Europe de l'Est. Elle touche principalement des populations ciblées en Europe de l'Ouest .

En 2017, environ 160 000 personnes ont été nouvellement diagnostiquées séropositives au VIH, dont près de 82% en Europe de l'Est. La Russie et l'Ukraine représente à elles deux 75% de tous les nouveaux cas. On observe une progression des nouveaux diagnostics en Europe de l'Est et Centrale, mais une stabilisation voire une diminution des taux dans plusieurs pays de l'Union Européenne (19).

2.1.3. Situation en France

En France, 172 700 personnes vivent avec le VIH. Parmi ces personnes, 86% connaissent leur statut VIH, 76% sont traités par trithérapie antirétrovirale et 74% ont une charge virale indétectable (20). En 2018, 6155 (IC95% : (5897 – 6412)) personnes ont découvert leur séropositivité. Ce chiffre est en diminution depuis 2017, après quelques années de stabilité. La diminution des cas nouvellement diagnostiqués peut se justifier par une augmentation du nombre de dépistages réalisés. Effectivement, ils permettent de réduire le nombre de personnes ignorant leur statut VIH. Le développement du concept TasP (« Treatment as Prevention ») et de la PrEP (Prophylaxie Pré-Exposition) chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes peuvent également expliquer cette diminution (21).

Les personnes nouvellement infectées ont été contaminées par transmission sexuelle (56% par rapports hétérosexuels et 40% par rapports sexuels entre hommes), et par usage de drogues injectables (2% des cas).

En 2018, environ 1700 personnes étaient déjà à un stade avancé de l'infection à VIH lorsqu'ils ont découvert leur séropositivité. Par ailleurs, on estime à 1205 (IC95% : (1002-1308)) le nombre de diagnostics de SIDA en 2018, ce qui représente une diminution de 24% depuis 2013 (22).

Le taux de découverte de séropositivité du VIH varie beaucoup d'une région française à une autre. Les régions le plus touchées sont la Guyane avec un taux de découverte 10 fois plus élevé que le taux français moyen, ainsi que la Guadeloupe, la Martinique et l'Île-de-France (23).

2.2. Histoire naturelle de l'infection par le VIH

Le VIH-1 étant responsable de la pandémie, le terme VIH fera essentiellement référence au VIH-1 dans les paragraphes suivants.

En l'absence de traitement antirétroviral, l'évolution spontanée de l'infection VIH peut se décomposer en trois phases : la primo infection ou phase aiguë, la phase cliniquement asymptomatique ou phase chronique, et le stade clinique SIDA (figure 4).

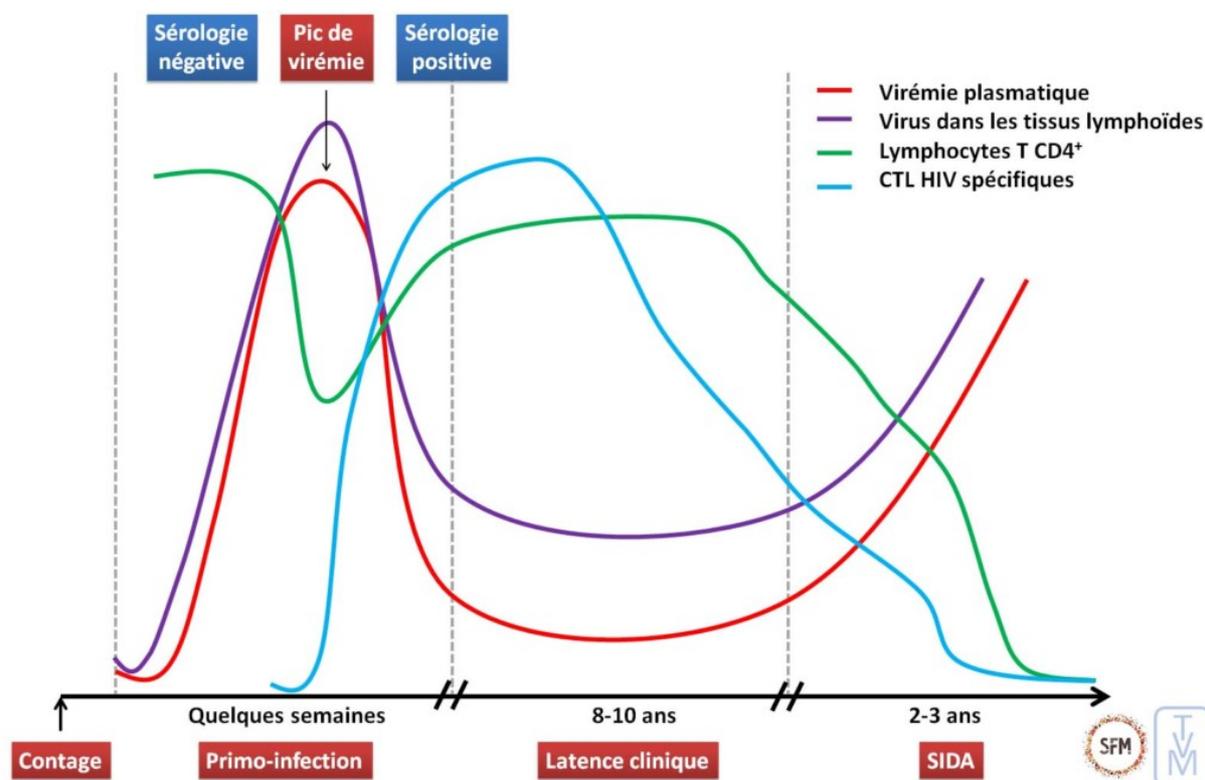


Figure 4 : Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1 au cours de temps (9).

2.2.1. Primo-infection

Après exposition au VIH, le virus infecte d'abord les cellules cibles des tissus muqueux, puis se propage rapidement aux organes lymphoïdes. Aux alentours du 10^{ème} jour, l'ARN du VIH devient détectable dans le sang, puis augmente de manière exponentielle jusqu'à atteindre un pic vers le 30^{ème} jour (environ 10⁶-10⁷ copies par mL). A cet instant, les anticorps anti-VIH apparaissent, bien que leur réponse reste inefficace en raison de la rapidité d'échappement du virus. On observe un contrôle partiel de l'infection par la réponse immunitaire adaptative (14).

Durant cette période de réplication virale intense, une personne sur deux est symptomatique. Ces manifestations cliniques sont les conséquences d'une activation et d'une inflammation intense. Elles sont observées généralement 10 à 15 jours après la contamination et peuvent durer jusqu'à 10 semaines (24). Elles sont peu spécifiques. On notera un syndrome pseudo-grippal avec fièvre dans plus de 90%

des cas, dysphagie, céphalées, myalgies, asthénie, amaigrissement. Un syndrome mononucléosique peut être le signe d'une primo-infection VIH. Les principales anomalies biologiques sont hématologiques : thrombopénie, leucopénie souvent associée à une neutropénie, et hépatiques : hépatite aigue cytolytique (25).

2.2.2. Phase cliniquement asymptomatique

Suite à la phase aiguë, le système immunitaire parvient à contrôler le niveau de réplication du VIH. Il s'établit alors un « équilibre » immuno-virologique pendant plusieurs années. Ainsi, le virus continue à se répliquer mais à un faible niveau. On parle de phase chronique asymptomatique, cliniquement latente mais biologique active (12).

2.2.3. Stade SIDA

En l'absence de traitement, après plusieurs années le VIH induit une destruction progressive des lymphocytes T CD4+ conduisant à une immunodéficience profonde (taux de cellules T CD4+ $<200/\text{mm}^3$) et à une inflammation chronique. A ce stade surviennent des infections opportunistes (infections à cytomégalovirus, pneumocystose, tuberculose, toxoplasmose ...) et/ou des maladies cancéreuses (lymphome malin non Hodgkinien, sarcome de Kaposi ...) (14).

Le développement du stade SIDA survient en médiane entre 11 ans après la séroconversion pour les 15-24 ans et 7,7 ans pour les 45-54 ans. La mortalité augmente elle aussi au fil du temps et en fonction de l'âge au moment de la séroconversion, avec une survie médiane de 12,5 ans après la séroconversion chez les patients entre 15-24 ans et 7,9 ans chez les patients de 45-54 ans (26).

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

2.3.1. Diagnostic biologique de l'infection par le VIH

En France, le nombre de tests de dépistage réalisés restent insuffisants malgré une augmentation avec 5,6 millions de sérologies effectuées en 2017. Les personnes qui ignorent leur séropositivité VIH sont à l'origine de la majorité des nouvelles contaminations et du maintien de l'épidémie en France. Ces personnes sont donc une priorité pour la HAS (27-29).

2.3.1.1. Cinétique des marqueurs biologiques de l'infection par le VIH

Dans les jours qui suivent la contamination, l'ARN viral plasmatique et l'antigène p24 sont les marqueurs les plus précoces. Il est possible de les détecter respectivement à environ 10 et 15 jours après l'infection (Figure 5). La charge virale et l'antigénémie p24 sont à leur maximum pendant la primo-infection, puis ils vont considérablement diminuer et se stabiliser, jusqu' à devenir indétectable pour l'Ag p24. La réponse anticorps anti-VIH se développe plus tardivement dans les 20 jours après la contamination, elle persiste tout au long de l'infection. La période qui précède la mise en évidence de ces anticorps par les analyses de dépistage est dénommée « fenêtre sérologique ». Ces délais d'apparition peuvent varier en fonction des techniques utilisées et de la réponse immunitaire de chaque individu (30).

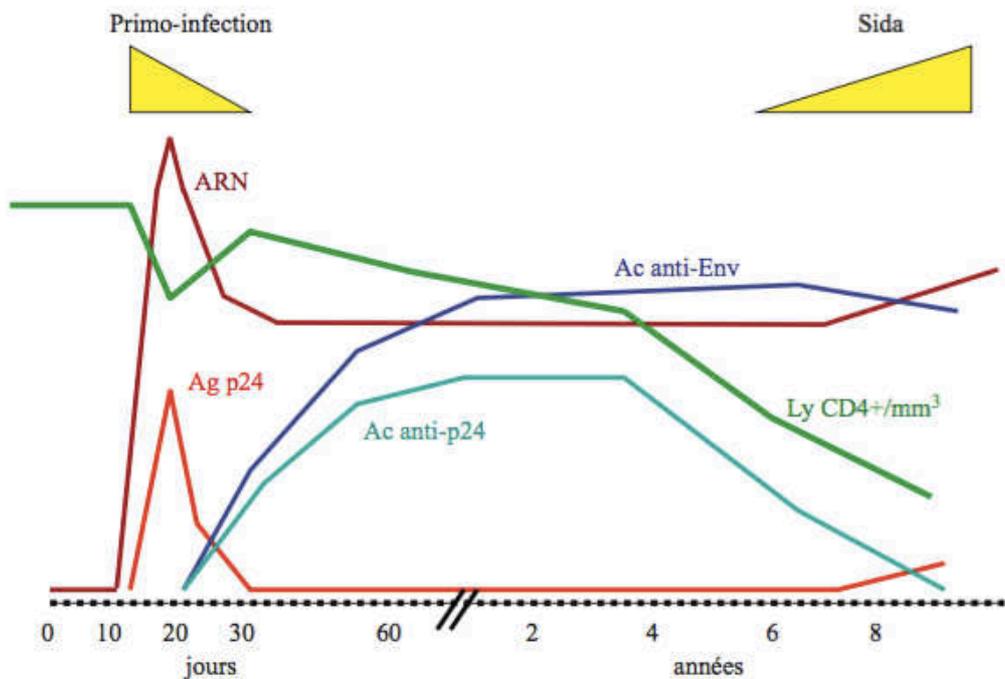


Figure 5 : Cinétique schématique des marqueurs virologiques de la primo-infection VIH en l'absence de traitement (31).

2.3.1.2. Stratégie du diagnostic biologique

Les conditions de réalisation du diagnostic biologique de l'infection à VIH sont décrites dans l'arrêté du 28 mai 2010 (32), ci-dessous :

« Pour le diagnostic biologique du virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2), tout laboratoire de biologie médicale (...) analyse isolément le sérum ou le plasma de chaque individu (...), utilisant une technique ELISA à lecture objective de détection combinée des anticorps anti-VIH 1 et 2 et de l'antigène p24 du VIH 1 (...).

En cas de résultat positif, une analyse de confirmation par western blot ou immunoblot est réalisée à l'initiative du biologiste médical sur le même échantillon sanguin et permet de différencier une infection à VIH 1 ou à VIH 2. Si le résultat de l'analyse de confirmation est négatif ou douteux, le biologiste médical effectue à son initiative sur le même échantillon sanguin une détection de l'antigène p24 du VIH 1, (...), confirmée par un test de neutralisation en cas de positivité. Lorsqu'il en a la possibilité, le biologiste médical peut réaliser à la place de cette détection, une recherche d'ARN viral plasmatique du VIH 1.

La présence des anticorps anti-VIH 1 et 2 ou de l'antigène p24 du VIH 1 chez un individu n'est validée qu'après réalisation d'un diagnostic biologique dans les conditions décrites au premier alinéa sur un échantillon sanguin issu d'un second prélèvement au moyen d'un réactif, revêtu du marquage CE, identique ou différent. »

L'algorithme de dépistage est présenté dans la figure ci-dessous :

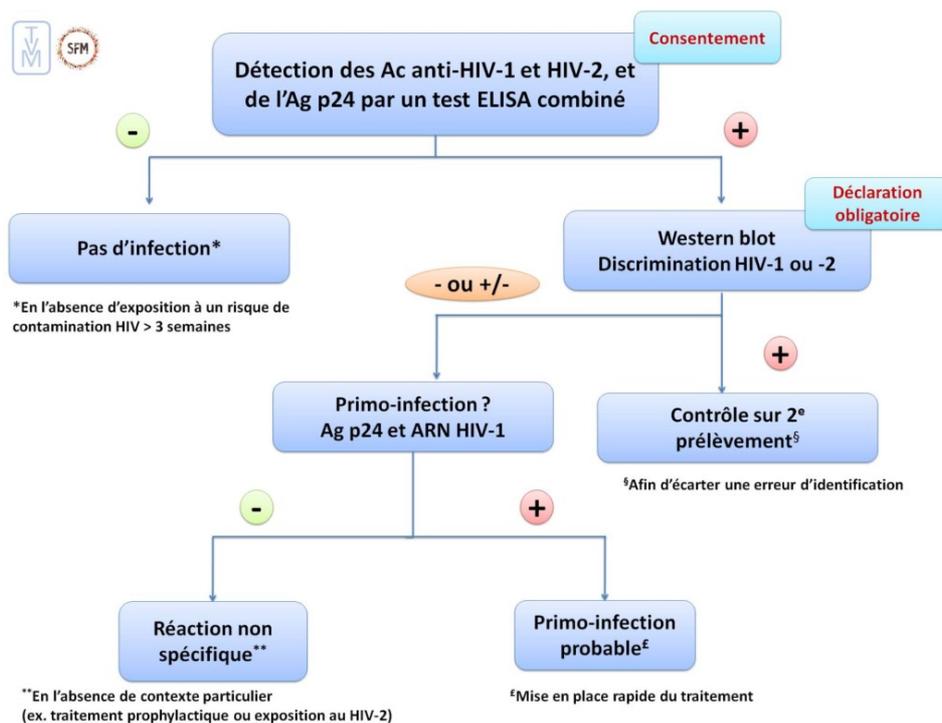


Figure 6 : Stratégie de dépistage de l'infection par le VIH, adulte et enfant > 18 mois (33).

Pour l'analyse de dépistage, les tests utilisés en laboratoire reposent sur la mise en évidence des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 par méthode immuno-enzymatique de type ELISA et de façon simultanée de l'antigène p24 du VIH-1. Ce test ELISA combiné de 4^{ème} génération requiert en France un seuil minimal de détection de l'Ag p24 inférieur à 20 pg/mL (27). Un test de dépistage négatif affirme l'absence de séroconversion vis-à-vis du VIH, excepté en cas d'exposition à un risque de contamination dans six semaines précédentes (31).

Les tests rapides sont considérés comme des TROD, en France. Ces tests unitaires immuno-chromatographiques permettent de rendre un résultat plus rapidement qu'un ELISA classique (moins de 30 minutes). Ils détectent uniquement les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Ils sont utiles dans certaines situations d'urgences et améliorent l'accès au dépistage pour différentes populations à risque qui ne recourent pas ou peu aux techniques classiques de dépistage. Un résultat négatif peut conclure à l'absence d'infection par le VIH en l'absence de prise de risque dans les trois derniers mois (27).

Pour l'analyse de confirmation, les techniques de référence sont le Western blot (WB) ou l'Immunoblot (IB). Elles doivent non seulement affirmer un diagnostic d'infection VIH mais également distinguer le type de virus VIH-1 ou VIH-2 (27). La différenciation entre les deux types de virus est cruciale de par la différence de pathogénicité, la résistance naturelle du VIH-2 aux inhibiteurs non nucléosidiques de la TI et de l'impossibilité à quantifier la charge virale VIH-2 avec les techniques classiques (34). En cas de résultat du WB ou de l'IB négatif ou indéterminé, la détection de l'Ag p24 seul est préconisée pour ne pas passer à côté d'une primo-infection au stade de pré-séroconversion (27). La détection de l'ARN plasmatique par PCR en temps réel est principalement utilisée dans le cadre de la prise en charge thérapeutique, mais elle peut également être demandée lors du diagnostic précoce de primo-infection (31).

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

2.3.2.1. Principes et objectifs du traitement antirétroviral

Les recommandations sont d'instaurer un traitement antirétroviral le plus tôt possible après le diagnostic chez toute personne vivant avec le VIH et quel que soit le stade clinique de l'OMS ou le nombre de lymphocytes T CD4+.

Les bénéfices retenus par l'initiation précoce de l'ARV sont une réduction de la morbi-mortalité liée à l'infection VIH avec un contrôle de la réplication virale, une meilleure préservation du système immunitaire, une diminution de l'inflammation systémique chronique (entraînant une diminution de pathologies cardiovasculaires, métaboliques et neurologiques ...), et une réduction majeure du risque de transmission du VIH.

Le principal objectif du traitement antirétroviral est de conserver ou de restaurer un taux de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500/mm³, ce qui implique de maintenir une charge virale plasmatique indétectable (< 50 copies/mL). Le but final étant de réduire le risque de progression vers le stade SIDA et/ou le décès (18).

2.3.2.2. Différentes classes d'antirétroviraux

Six classes d'antirétroviraux sont actuellement disponibles. Elles sont définies par leur mécanisme d'action inhibiteur au niveau d'une étape du cycle de réplication du VIH : les inhibiteurs de la transcriptase inverse comprenant les analogues nucléos(t)idiques et les analogues non nucléosidiques ; les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs de la protéase et les inhibiteurs d'entrée (antagonistes du co-récepteur CCR5 et inhibiteurs de fusion).

- **Les inhibiteurs de la transcriptase inverse :**

- *Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) :*

Les principaux inhibiteurs nucléosidiques actuellement utilisés en France comprennent l'abacavir (ABC), l'emtricitabine (FTC), la lamivudine (3TC), et la zidovudine (ZDV). Ce sont des dérivés de nucléosides naturels, dépourvus du groupement 3'OH. Ils nécessitent une triphosphorylation intracellulaire pour être actifs. Ces molécules entrent en compétition avec les nucléosides naturels au niveau de la transcriptase inverse. Après incorporation, ils vont stopper la synthèse de l'ADN viral en fonctionnant comme terminateur de chaîne.

Le ténofovir (TDF) est un analogue nucléotidique de la TI. Il agit de la même manière que les inhibiteurs nucléosidiques mais possède déjà une première phosphorylation (37,38).

- *Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI) :*

Les INNTI comprennent l'efavirenz (EFV), l'etravirine (ETR), la névirapine (NVP), la rilpivirine (RPV) et la doravirine (DOR). Ils se positionnent au niveau de la poche

hydrophobe du domaine p66 de la transcriptase inverse, à proximité du site catalytique. Ils engendrent une perte de flexibilité du site actif de la TI, ce qui va altérer sa capacité à synthétiser l'ADN viral (38).

- **Les inhibiteurs de l'intégrase (INI) :**

On distingue les INI de première génération que sont l'elvitegravir (EVG) et le raltegravir (RAL) et ceux de deuxième génération que sont le dolutegravir (DTG), le bictegravir (BIC) et le cabotegravir (CAB). Ces molécules bloquent le transfert de l'ADN viral par liaison à l'ADN cellulaire en se fixant au niveau du site catalytique de l'intégrase (39).

- **Inhibiteurs de protéase (IP) :**

Les principaux IP actuellement utilisés en France sont des IP de 1^{ère} génération comme le ritonavir (RTV), le saquinavir (SQV) et le lopinavir (LPV), et de 2^{ème} génération que sont le tipranavir (TPV), atazanavir (ATV) et darunavir (DRV). Les IP interviennent en inhibant le site actif de la protéase du VIH-1. Cette enzyme étant indispensable à la transformation des polyprotéines Gag et Gag-Pol en protéines structurales matures (40).

- **Les inhibiteurs d'entrée :**

- *Inhibiteurs de fusion (IF) :*

L'enfuvirtide (T-20) est un peptide synthétique bloquant l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte en se liant au domaine HR1 de la gp41. Cette inhibition compétitive va empêcher la formation de la structure en six hélices et ainsi perturber les changements de conformation nécessaire à la fusion des membranes virales et cellulaires (16).

- *Antagonistes des corécepteurs CCR5 (anti-CCR5) :*

Le celsentri (MVC) inhibe l'attachement de la gp120 du VIH au récepteur cellulaire CCR5. En conséquence, les virus avec un tropisme CCR5 ne peuvent plus entrer dans la cellule cible. Avant d'initier ce type de traitement, il est nécessaire de réaliser un test de tropisme pour détecter les variantes minoritaires CXCR4 (41).

- **Schémas thérapeutiques et recommandations :**

Depuis 2018, le traitement de première ligne est une trithérapie basée sur la combinaison de deux INTI avec un troisième agent. Le choix de ce premier traitement doit être adapté à chaque patient. Le but de ce traitement initial est d'obtenir une charge virale plasmatique < 50 copies/mL en six mois.

Le choix des deux INTI se porte sur deux associations préférentielles: ténofovir disoproxil fumarate/emtricitabine et abacavir/lamivudine. Le troisième agent peut être, un IP avec addition d'une faible dose de ritonavir (IP/r), un INNTI, ou un INI (35).

Le choix de ces molécules doit s'effectuer en fonction de trois critères principaux, afin d'éviter la survenue de résistances :

- Une barrière génétique élevée : capacité de résister à la résistance.
- Une puissance virologique : contrôle rapide de la charge virale plasmatique.
- Une bonne tolérance : éviter les échecs thérapeutiques par inobservance (42).

En cas d'échec virologique, la trithérapie reste également la règle après évaluation de l'observance, des interactions médicamenteuses et des mutations de résistance.

Chez les patients en succès virologique, les recommandations 2019 de l'European AIDS Clinical Society (EACS) prévoient la possibilité d'utiliser une bithérapie après une analyse soigneuse de l'histoire clinique et thérapeutique (43).

2.3.2.3. Suivi virologique

- **Mesure de la charge virale**

A l'initiation du traitement antirétroviral, il est nécessaire de vérifier l'efficacité du traitement par une mesure régulière de la charge virale plasmatique. Les objectifs à atteindre sont une charge virale diminuée de 2 log₁₀copies/mL en un mois de traitement, une charge virale < 400 copies/mL en trois mois, et enfin une charge virale indétectable (< 50 copies/mL) en six mois. Lorsque ces objectifs ne sont pas respectés, il est nécessaire de rechercher une inobservance en interrogeant le patient, des interactions médicamenteuses ou un sous-dosage des antirétroviraux (44). Lorsque la charge virale d'un patient est contrôlée depuis plus de 2 ans avec un taux de CD4+ > 500/mm³ depuis au moins 1 an, le suivi biologique peut être espacé tous les semestres, intercalés avec un bilan annuel de synthèse hospitalière.

Une reprise ou une persistance de la réplication virale peut survenir sous traitement antirétroviral. Un changement de thérapeutique doit être effectué qu'après avoir vérifié à deux reprises la virémie et exclu toutes autres causes évidentes. Le but étant de distinguer les « blips » d'un échec thérapeutique. En effet, un « blips » est une virémie transitoire, de faible amplitude, retrouvé sur un seul prélèvement le plus souvent conséquence d'un épisode infectieux aigu, d'une inobservance ponctuelle ou d'une modification de la sensibilité de la technique (42).

- **Étude de la résistance aux antirétroviraux**

- *Principe de la résistance du VIH aux antirétroviraux :*

La variabilité génétique du VIH-1 est à l'origine de l'apparition de nombreuses mutations et donc de la production de nombreux variants. Ainsi, avant même initiation d'un traitement, une population minoritaire de variants mutés préexiste. Lorsqu'une mutation se situe au niveau d'une des régions cible des antirétroviraux (transcriptase inverse, protéase ou intégrase), le virus va perdre en sensibilité. Cet avantage répliatif sous traitement vis-à-vis des virus sauvages va permettre aux variants mutés de devenir prédominant. La pression de sélection est dépendante des concentrations plasmatiques en antirétroviral, de la puissance et de la barrière génétique de la molécule, ou encore de la préexistence de résistances (45,46).

Lors d'une réplication virale non contrôlée, la barrière génétique d'un antirétroviral correspond au nombre de mutations nécessaires au virus pour qu'il devienne résistant au traitement. Un antirétroviral a une barrière génétique faible vis-à-vis du VIH lorsqu'une seule mutation est suffisante pour obtenir un niveau de résistance élevée. Lorsque plusieurs mutations successives sont nécessaires, la barrière génétique à la résistance est dite élevée (47,48).

- *Méthodes d'étude de la résistance aux antirétroviraux :*

Les deux types de tests permettant de déterminer la sensibilité aux antirétroviraux sont les tests phénotypiques et les tests génotypiques.

Les tests phénotypiques mesurent *in vitro* la capacité du virus à se multiplier au sein d'une culture cellulaire en présence de concentrations croissantes de l'antirétroviral à tester. Le résultat est déterminé par le rapport entre les concentrations inhibitrices 50% (ou 90%) de la souche du patient et de la souche sensible de référence. Ainsi

une augmentation du rapport signe une résistance de la souche du patient. Il existe également des tests phénotypiques utilisant un virus recombinant développé à partir de l'ARN viral plasmatique du patient. Ces tests sont actuellement réservés à la recherche (49).

Le génotypage de résistance est la méthode de référence pour le suivi des patients en routine au laboratoire. Il est fondé sur l'analyse des gènes de la transcriptase inverse, de la protéase et de l'intégrase du VIH-1 par séquençage, afin de détecter la présence de mutations de résistance. Il sera détaillé dans le chapitre 3.

- **Quantification de l'ADN proviral :**

La quantification de l'ADN proviral est une méthode d'évaluation du réservoir du VIH. Elle sera développée dans le chapitre 4.

3. Génotypage de résistance du VIH-1

3.1. Indications

La prescription d'un test de génotypage de résistance est recommandée dans les situations ci-dessous :

- Diagnostic de l'infection VIH.
- Avant initiation d'un traitement.
- Échec du traitement (défini par 2 charges virales plasmatiques > 50 copies/mL).
- Autres situations : prophylaxie post-exposition, grossesse, symptômes neurologiques avec détection d'ARN VIH dans le LCR (45,46).

3.2. Tests génotypiques de résistance

Le génotypage de résistance est réalisé par séquençage des gènes du VIH qui sont les cibles des antirétroviraux, afin d'identifier des mutations associées à la résistance. Deux méthodes de séquençage sont actuellement utilisées dans les laboratoires cliniques : le séquençage Sanger et les méthodes de séquençage de nouvelle génération.

3.2.1. Séquençage Sanger

Cette technique de séquençage de l'ADN par synthèse enzymatique nécessite l'utilisation de didéoxynucléotides triphosphates (ddNTP). Les ddNTP ou « terminateurs de chaîne » sont des analogues des nucléotides naturels dATP, dCTP, dGTP et dTTP dont le groupement OH de l'extrémité 3' a été remplacé par un hydrogène. Lors de la synthèse du brin complémentaire du fragment d'ADN à séquencer, les ddNTP vont être insérés de façon aléatoire à un endroit plus ou moins précoce de la séquence. Une fois incorporés, les ddNTP vont bloquer la poursuite de l'élongation aboutissant ainsi à la synthèse de fragments d'ADN de différentes tailles. Auparavant, ces fragments étaient triés par tailles croissantes en utilisant la migration sur gel d'agarose (50).

Depuis, cette technique a subi plusieurs évolutions notamment l'utilisation de ddNTP marqués par quatre fluorochromes différents « dye terminator sequencing » (51) et la semi-automatisation avec la mise en place de l'électrophorèse capillaire (Figure 7). Ces améliorations ont permis l'analyse de séquences plus longues, de gagner en rapidité en analysant plusieurs échantillons en même temps et d'obtenir une meilleure sensibilité (52). Actuellement, la méthode Sanger est la technique la plus utilisée en routine dans les laboratoires.

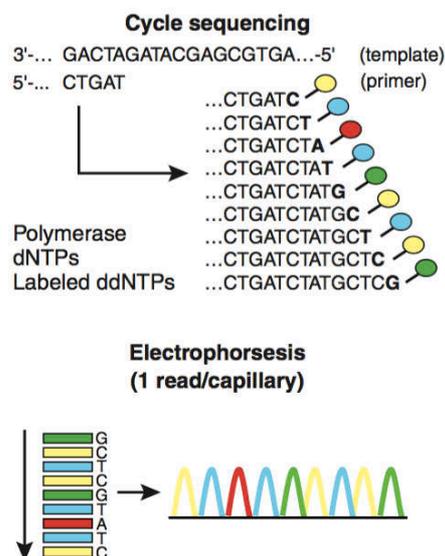


Figure 7 : Principe du séquençage Sanger (52).

Les signaux sont ensuite interprétés informatiquement afin de reconstituer la séquence.

3.2.2. Séquençage de nouvelle génération (NGS, en anglais)

Le séquençage haut débit repose sur la génération et la lecture de manière simultanée de millions de petites séquences d'ADN indépendantes. A la fin du séquençage, les données brutes sont sauvegardées dans un fichier Fastq sous forme de « reads ». Ces données sont réorganisées à l'aide d'outils bioinformatiques afin de reconstruire la séquence d'ADN étudiée. Ce brin d'ADN est ensuite comparé à la séquence de référence, cette étape nécessite une interprétation biologique.

Plusieurs plateformes de NGS ont été développées. Les deux technologies les plus utilisées actuellement dans les laboratoires de virologie clinique sont la technologie Ion Torrent® et la technologie Illumina®.

Les principales étapes des plateformes NGS sont :

- La préparation de la librairie qui consiste en la fragmentation de l'ADN et la ligation des adaptateurs aux deux extrémités des fragments.
- L'amplification clonale de ces fragments d'ADN provenant du pool de librairie permettant d'obtenir des milliers de copies de ces fragments et d'amplifier le signal.
- Le séquençage par synthèse : par l'intermédiaire d'une ADN polymérase permettant l'incorporation de nucléotides complémentaires du brin d'ADN à séquencer. Ces plateformes reposent toutes sur le déchiffrement de cette séquence en bases de chaque fragment (52,53).

Nous décrivons brièvement ci-dessous les technologies Ion Torrent® et Illumina®.

3.2.2.1. La technologie Ion Torrent®

La plateforme Ion Torrent utilise la technologie des semi-conducteurs par l'intermédiaire d'une puce ionique contenant des capteurs capables de détecter des variations de pH. Au fur et à mesure du séquençage, les différents nucléotides vont être apportés de manière successive. Lorsque l'un d'entre eux va être complémentaire de la base de la matrice à séquencer, il va être incorporé dans le brin en cours de synthèse. En conséquence un proton H⁺ est relargué dans la solution réactionnelle environnante provoquant une modification de son pH. Le signal proportionnel détecté est converti en données de séquence. Si cette approche est

peu coûteuse, elle s'avère toutefois moins fiable en raison des difficultés techniques (54,55). Les différentes étapes de la plateforme sont décrites dans la figure 8.

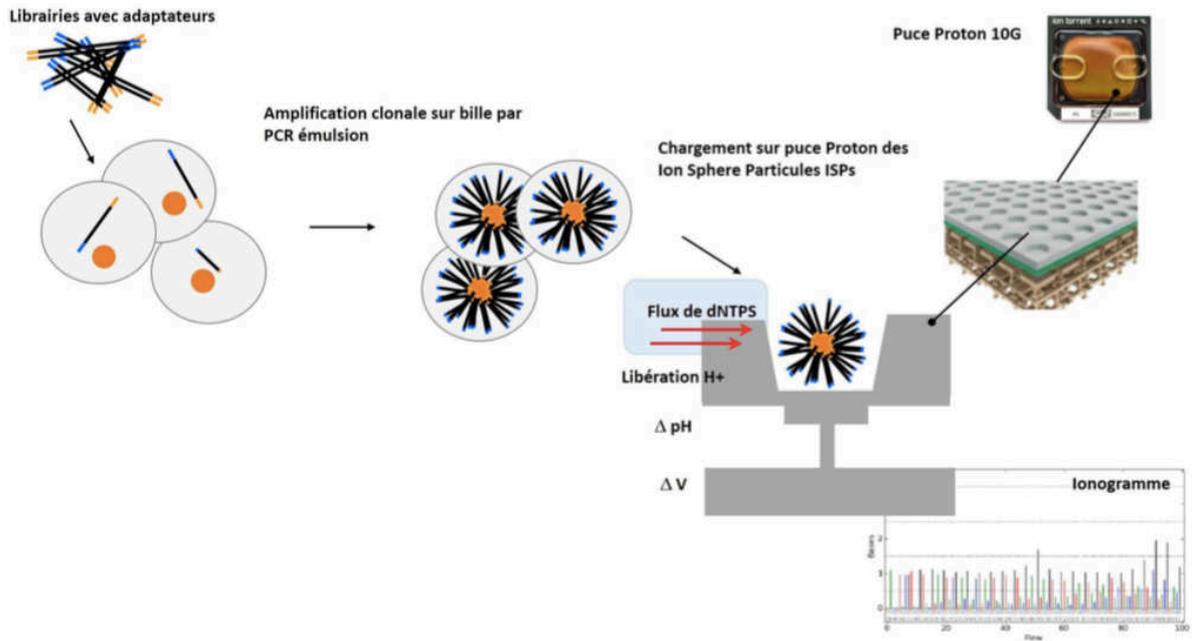


Figure 8 : Principe du séquençage haut débit sur l'analyseur PGM Ion Torrent (56).

3.2.2.2. La technologie Illumina ®

La plateforme Illumina recourt à une technologie basée sur la fluorescence (Figure 9). Cette technique de séquençage se fait par incorporation de nucléotides à terminaison réversible marqués par des fluorochromes spécifiques à chaque nucléotide. Les quatre nucléotides sont envoyés simultanément sur la flow cell à chaque cycle de séquençage, et une seule base est incorporée par cycle. A chaque incorporation les nucléotides sont excités par un laser permettant de détecter les signaux lumineux spécifiques de chaque nucléotide sur l'ensemble de la flow cell à chaque cycle grâce à une caméra (53,55).

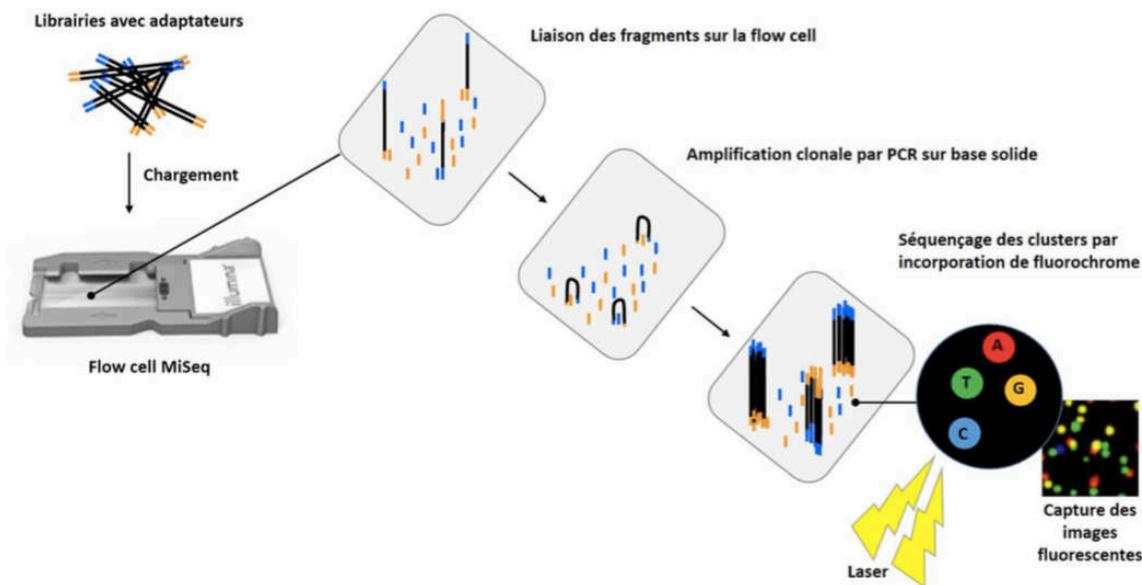


Figure 9 : Principe du séquençage haut débit de la plateforme Illumina (56).

3.2.3. Principales mutations associées à des résistances aux antirétroviraux

Les mécanismes à l'origine des mutations de résistance diffèrent en fonction de la classe d'antirétroviral et des molécules de cette classe. En France, une liste de ces mutations est proposée et régulièrement mise à jour par le groupe AC11 de l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales) (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

Les principaux mécanismes sont décrits ci-dessous :

3.2.3.1. Résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse

- **Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)**

Les deux principaux mécanismes responsables de la résistance aux INTI sont : l'excision et l'exclusion. L'augmentation de l'excision des analogues nucléosidiques déjà incorporés dans l'ADN viral est induite par les mutations TAM (thymidine analog mutations). Ces mutations favorisent l'afflux d'ATP au niveau du site de polymérisation de la TI, ce qui permet à l'ATP d'interagir avec la liaison reliant l'INTI à l'ADN viral. La libération de l'analogue entraîne la reprise de la synthèse de l'ADN

viral. Il existe 6 TAM, sélectionnées séquentiellement, elles peuvent selon leur nombre conduire à une résistance croisée à l'ensemble des INTI.

La diminution de l'incorporation des analogues nucléosidiques au bénéfice des nucléosides naturels est engendrée par d'autres mutations spécifiques d'un antirétroviral donné (37,45).

- **Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)**

Un seul changement d'acide aminé au niveau du site de fixation des INNTI, c'est-à-dire au niveau de la poche hydrophobe située à proximité du site actif de la transcriptase inverse, entraîne une perte d'affinité pour cette molécule. La barrière génétique du VIH-1 vis à vis des INNTI est faible, puisqu'une seule mutation peut être à l'origine d'une résistance à haut niveau (45).

3.2.3.2. Résistances aux inhibiteurs de la protéase

La résistance aux inhibiteurs de la protéase est un mécanisme progressif qui requiert une accumulation successive de mutations. On distingue :

- Les mutations majeures (ou primaires) qui vont diminuer la liaison de l'IP au site actif de la protéase virale. Ces mutations apparaissent les premières lors d'un échappement virologique. Elles sont spécifiques d'un IP et conduisent à une augmentation importante de la résistance.
- Les mutations mineures (ou secondaires) qui vont renforcer la résistance et compenser la perte de capacité répliquative liée aux mutations primaires. Elles peuvent faire partie du polymorphisme génétique de la protéase virale ou survenir plus tardivement.

La présence de mutations au niveau du gène gag, plus précisément dans les sites de clivage de la protéase, semblent également induire une résistance aux IP.

Les IP bénéficient de la barrière génétique la plus élevée à la résistance parmi les antirétroviraux la sélection de mutation en cas d'échec est rare (45).

3.2.3.3. Résistances aux inhibiteurs de l'intégrase

Les mutations de résistance aux inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 apparaissent à proximité du site actif de l'intégrase et conduisent à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour ces molécules. La barrière génétique du VIH vis-à-vis des INI de 1ère

génération, raltegravir et elvitegravir, est faible et ces molécules présentent une résistance croisée. Le dolutegravir, le bictegravir et le cabotegravir, INI de 2^{ème} génération, quant à eux, possèdent une barrière génétique plus élevée que les molécules précédentes (37).

3.2.3.4. Résistances aux inhibiteurs de fusion

Les mutations associées à la résistance à l'enfuvirtide apparaissent très rapidement en cas de réplication virale sous T20. Elles sont retrouvées dans une zone bien précise de la gp41, entre les codons 36 et 45 inclus. La barrière génétique à la résistance est très faible pour cet antirétroviral. Il n'existe pas de résistance croisée avec les inhibiteurs aux anti-CCR5 (49).

3.2.3.5. Résistances aux inhibiteurs aux anti-CCR5

Les deux mécanismes qui interviennent dans la résistance à l'inhibiteur du corécepteur CCR5 sont l'émergence d'une sous-population du virus R4 minoritaire dès l'initiation du traitement et l'apparition de mutations au niveau de la gp120 conférant une résistance au virus R5 (37).

3.2.4. Outils d'interprétation des mutations de résistance

Les algorithmes permettent de donner un sens clinique aux données issues des tests génotypiques en prédisant le succès ou l'échec thérapeutique. Ces règles d'interprétations permettent d'assembler une mutation ou une combinaison de mutations à une réponse virologique vis-à-vis d'une molécule antirétrovirale. Ainsi, les séquences obtenues du patient sont comparées aux séquences du virus de référence sensible. Lors du rendu de résultats, le degré de résistance à l'antirétroviral est défini par les termes : « sensible » ou « résistance possible » ou « résistance ».

Les principaux algorithmes permettant d'interpréter les mutations de résistance sont ceux de l'ANRS (France), de Stanford (États-Unis) et Rega (Belgique). En pratique, en France, l'algorithme de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>) est le plus utilisé. L'interprétation des résultats nécessite un dialogue clinico-biologique reprenant l'histoire du traitement, la charge virale et le taux de lymphocytes TCD4+

ainsi que l'ensemble des résultats des tests génotypiques préexistants du patient (45,57).

4. Le réservoir du VIH

4.1. Description du réservoir du VIH-1

L'existence d'un réservoir du VIH-1 constitue le principal obstacle à l'éradication du virus par la réponse du système immunitaire et les traitements antirétroviraux. Ce réservoir permet la persistance du virus à long terme dans les cellules hôtes, et est à l'origine du rebond virologique à l'arrêt des traitements.

Dès la primo-infection, les cellules infectées par le VIH vont disséminer très rapidement dans tout l'organisme. Les ganglions infectés vont permettre l'amplification et la diffusion de l'infection à de nombreux sites anatomiques et ainsi constituer les réservoirs cellulaires et tissulaires (58).

4.1.1. Réservoirs cellulaires

Les lymphocytes T CD4+ mémoires représentent les réservoirs cellulaires majoritaires du VIH-1 dans le sang périphérique et les tissus. Plusieurs sous-populations lymphocytaires très hétérogènes sont retrouvées, selon leur état de différenciation. On distingue les cellules T CD4 naïves (TN) et les cellules mémoires spécifiques d'un antigène avec les cellules souches mémoires T (*stem cell memory T-cell* : TSCM), les lymphocytes mémoires centraux (*central memory T-cell* : TCM), les lymphocytes mémoires transitionnels (*transitional memory T-cell* : TTM) et les lymphocytes mémoires effecteurs (*effector memory T-cell* : TEM) (58,59). La capacité à persister et à proliférer de ces cellules, en particulier des cellules naïves, leurs confèrent un rôle important dans le maintien à long terme du réservoir VIH. Les lymphocytes mémoires effecteurs quant à eux favorisent le développement du réservoir en étant des cibles faciles à infecter par le virus en exprimant majoritairement le corécepteur CCR5 à leur surface, comme indiqué sur la figure 10 (58).

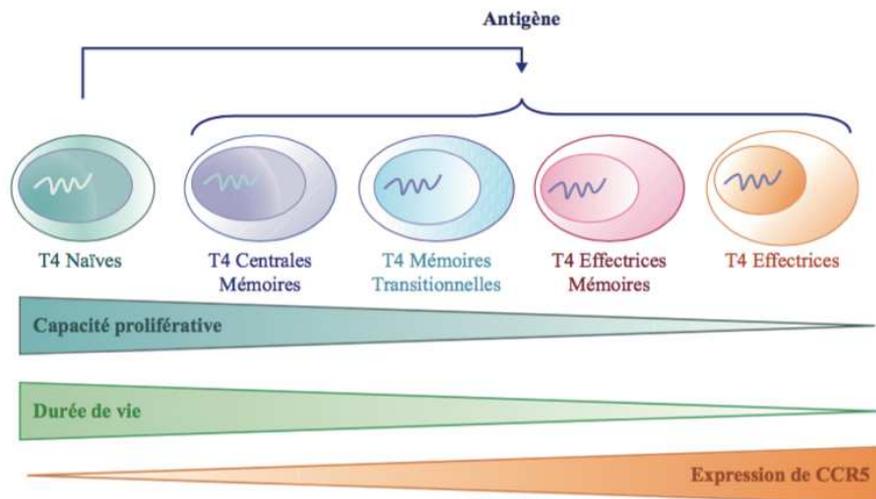


Figure 10 : Capacité proliférative et durée de vie des sous populations LT CD4+ (51).

Parmi les autres types cellulaires, les monocytes et macrophages sont des cibles potentielles du VIH mais à moindre degré que les lymphocytes T CD4+. Ce faible niveau d'infection peut être expliqué par une plus faible expression du récepteur CD4+, une transcription inverse et un import dans le noyau cellulaire moins efficace. Une réplication virale plus lente avec un pic à 5 et 8 jours après l'infection contre 30 à 40h pour les lymphocytes T CD4+ est un argument supplémentaire. Cependant, les macrophages ont une longue durée de vie et sont retrouvés dans de nombreux tissus permettant ainsi au virus de se propager et d'établir un réservoir de persistance du VIH-1. Les cellules dendritiques jouent probablement aussi un rôle dans la durabilité du virus (59).

4.1.2. Réservoirs tissulaires

Les cellules réservoirs sont réparties dans différents tissus de l'organisme. Le principal réservoir est constitué par les organes lymphoïdes secondaires. La quasi-totalité des lymphocytes de l'organisme résident dans les tissus lymphoïdes. La répartition du virus au sein des compartiments tissulaires est inégale, dépendante du lieu de résidence et des capacités de migration de ces cellules infectées, aboutissant ainsi à des niveaux de réservoirs variables (Figure 11).

- Les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et tissu lymphoïde digestif) sont des réservoirs majeurs pour le VIH-1 car ils contiennent de forte concentration en lymphocytes T CD4+, et plus particulièrement en lymphocytes folliculaires auxiliaires (Tfh). Au sein des ganglions lymphatiques, les Tfh notamment

les cellules dendritiques folliculaires de par leur durée de vie de plusieurs mois permettent la persistance de l'infection. Une réplication virale chronique est également entretenue par les Tfh en infectant de nouvelles cellules T CD4+ (60). La rate est un organe important dans le maintien du réservoir du fait de sa richesse cellulaire (contient un quart des lymphocytes et de nombreux macrophages), et de sa position stratégique à l'intersection entre le système immunitaire et circulatoire. Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT), étant donné de sa taille, comprend de très nombreux lymphocytes. En effet, la quantité de cellules CD4+ infectées par le VIH est plus importante en comparaison à celle du sang (60).

- Les organes lymphoïdes primaires sont dans une moindre mesure que les organes lymphoïdes secondaires, un potentiel réservoir du VIH. L'isolement d'ADN de VIH dans des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse a permis de renforcer cette notion (62).

- Le VIH peut s'intégrer dans les lymphocytes T CD4+ retrouvés dans de nombreux sites anatomiques formant ainsi des réservoirs du virus tels que les organes génitaux, le système nerveux central (SNC), les poumons, le foie ou encore la peau et les tissus adipeux (59).

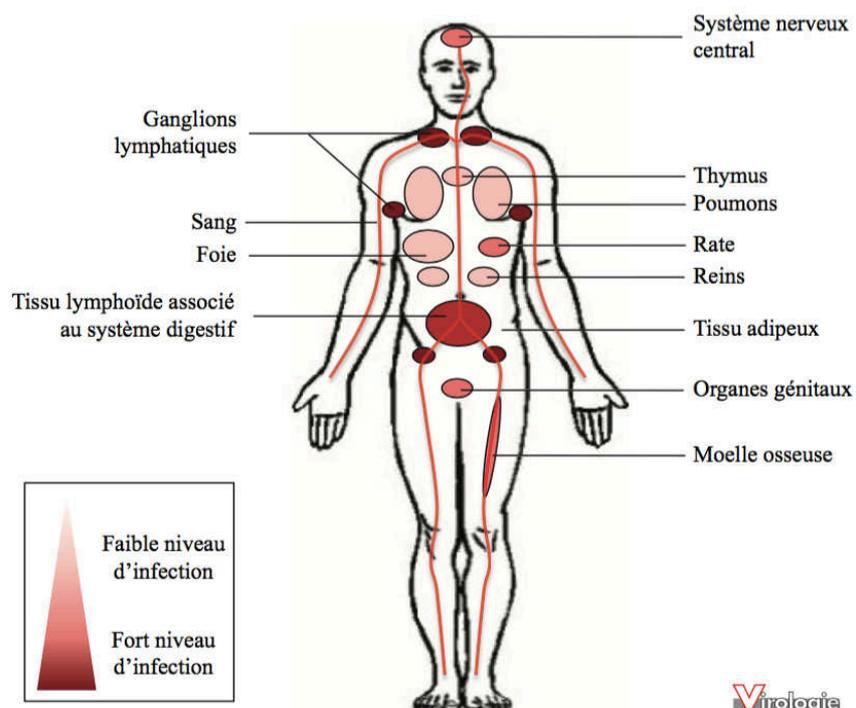


Figure 11 : Tissus et organes contribuant au réservoir du VIH-1 : L'intensité de coloration est fonction du degré d'infection de chaque site (52).

4.1.3. Les différentes formes d'ADN VIH-1 associées aux cellules

L'entrée du virus dans la cellule hôte va s'accompagner de la transcription inverse de l'ARN viral en ADN, qui s'intègre ensuite dans le génome de la cellule hôte. L'ADN proviral intégré va servir de matrice pour la synthèse de protéines virales et l'accomplissement du cycle viral (63). En plus de ces formes intégrées d'ADN VIH-1, les provirus, on trouve également des formes linéaires d'ADN VIH, qui sont des formes pré-intégratives labiles, et des formes épisomales circulaires à 1- ou 2-LTR qui correspondent probablement à des échecs d'intégration comme le montre la figure 12 (59).

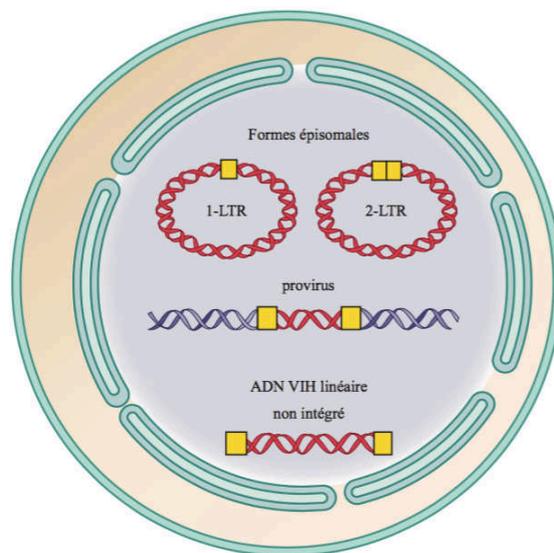


Figure 12 : Les différentes formes d'ADN du VIH-1 (63).

On retrouve parmi l'ensemble des génomes viraux intégrés de nombreuses formes défectives, partiellement délétées ou hypermutées, à cause d'erreurs enzymatiques au cours du cycle de réplication ou suite à l'action des différents facteurs de restriction de l'hôte. Ces formes sont majoritaires et seulement un faible pourcentage des génomes viraux présents sont intacts et peuvent être réactivés et aboutir à la production de particules virales infectieuses (Voir figure 13). Ils constituent les réservoirs latents du VIH (64,65). Une définition plus large du réservoir inclut également les génomes viraux n'aboutissant pas à cette synthèse de particules virales infectieuses mais pouvant néanmoins être en partie transcrits, voire traduits en protéines. Ces formes pourraient alors contribuer à l'activation du système immunitaire et ainsi à la physiopathologie d'infection VIH-1 (59).

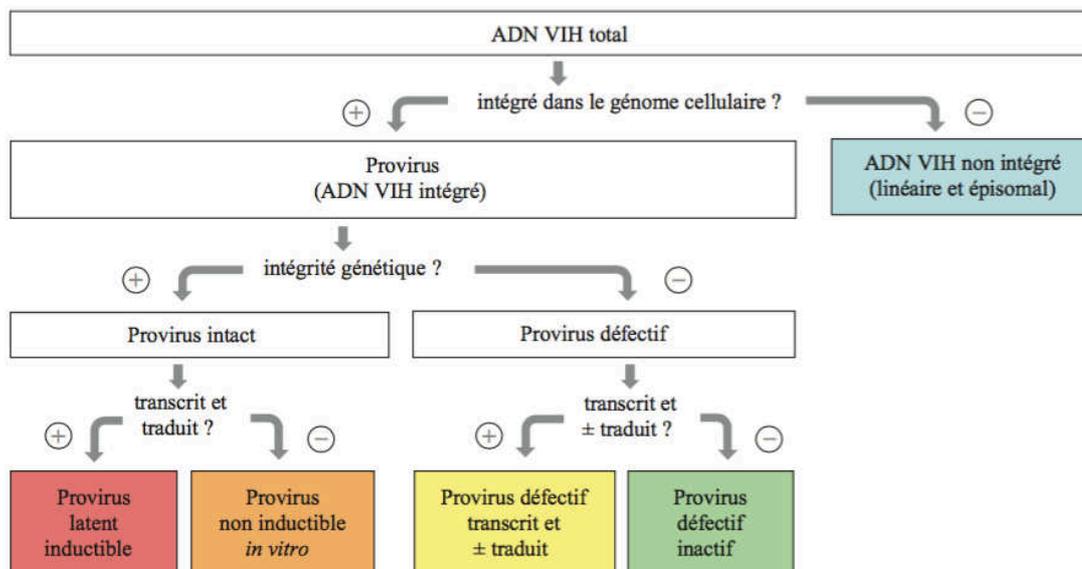


Figure 13 : Les différentes formes intégrées et non intégrées d'ADN VIH-1 (59).

4.2. Mécanisme de persistance du VIH-1

Le maintien du réservoir VIH à long terme peut s'expliquer par trois mécanismes principaux :

- La **réplication virale** aboutissant à la libération de virions capables d'infecter de nouvelles cellules. Chez des patients sous traitement antirétroviral efficace, la réplication est résiduelle.
- La **persistance de cellules infectées à longue demi-vie**. Les lymphocytes T CD4+ mémoires quiescentes par exemple, ont une demi-vie de 44 mois.
- La **prolifération clonale de cellules infectées** permettant la transmission de l'ADN proviral intégré dans le génome des cellules filles.

L'intensité de ces phénomènes peut être variable en fonction du site anatomique du réservoir, du stade de l'infection, de l'état d'activation de la différenciation cellulaire et de la mise en place ou non d'un traitement (59).

La persistance du VIH-1 est multifactorielle et plusieurs mécanismes moléculaires d'origine cellulaire et virale ont été évoqués pour expliquer la latence. Ces mécanismes peuvent résulter de l'élongation inefficace de la transcription du génome viral, de la présence d'un complexe de pré-intégration déficient, de la présence de facteurs de restriction dont l'APOBEC3G, ainsi que d'autres phénomènes post-transcriptionnels, par exemple la surexpression de miARNs (9).

4.3. Quantification du réservoir et intérêt clinique

Plusieurs approches quantitatives complémentaires ont été proposées pour quantifier le réservoir. Les différentes méthodes ne détectent pas les mêmes formes du virus et aucune ne peut répondre à toutes les questions posées, selon que l'on cherche à mesurer un réservoir latent, répliatif, productif, voire infectieux. Ces méthodes comprennent des techniques de culture cellulaire, mais surtout des techniques moléculaires notamment la PCR quantitative en temps réel et parfois la PCR digitale ou le séquençage.

4.3.1. Les méthodes de quantification du réservoir

Les méthodes de culture cellulaire ont pour but d'estimer le nombre de cellules latentes capables de produire du virus. La production virale est évaluée par la mesure de l'antigène p24 ou de l'ARNm nouvellement produit. Ces approches ont l'avantage d'estimer la capacité des cellules infectées à produire des virus infectieux, mais présentent l'inconvénient de sous-estimer la taille du réservoir (64).

La quantification spécifique de l'ADN VIH intégré est possible grâce à une PCR amplifiant la région entre le génome viral et les motifs *Alu* qui sont répétés dans tout le génome humain, suivie d'une quantification par PCR nichée. Pour la quantification, il peut être difficile d'obtenir un standard qui reflète la variabilité de distance entre le génome viral intégré et le motif *Alu* le plus proche (59,66).

Les formes non intégrées : la quantification des formes circulaires 2-LTR est possible grâce à une PCR au niveau de la jonction U5-U3, contrairement à celle des cercles 1-LTR qui reste difficile à cause de l'absence de motif spécifique dans leur séquence. Les formes non intégrées ont une demi-vie bien plus courte que l'ADN VIH intégré et sont le reflet d'une répliation virale récente. Ces formes disparaissent généralement après six mois de traitement antirétroviral (59,67).

L'activité transcriptionnelle du réservoir : elle peut être estimée par la quantification des transcrits viraux (ARN VIH associé aux cellules). Chez les patients traités, le rapport transcrits/ADN VIH permet peut permettre d'évaluer l'activité transcriptionnelle du réservoir (68).

Le séquençage du génome complet ou quasi complet, facilité par les techniques de séquençage haut débit, peut apporter une information qualitative sur le réservoir du VIH, ou bien seulement une quantification relative du nombre de formes intactes ou défectives. Ainsi, après élimination des génomes contenant de grandes délétions internes, des insertions ou délétions responsables de décalages du cadre de lecture, des codons stops, ou des hypermutations induites par APOBEC3G/3F, on estime que seulement 2 à 12% des génomes étudiés sont intacts et supposés compétents pour la réplication (59). Une méthode quantitative a été très récemment décrite pour identifier les délétions et hypermutations les plus fréquentes (69).

Néanmoins, en pratique clinique, la méthode la plus simple et la plus reproductible est la quantification de l'ADN total VIH-1 (qui regroupe les formes intégrées, les formes épisomales à 1- ou 2-LTR et les formes linéaires non intégrées) dans les cellules mononucléées du sang périphérique ou dans d'autres prélèvements tissulaires. Ainsi plusieurs techniques ciblant notamment la région LTR ont montré de bonnes performances, et un intérêt pronostique au cours de l'infection VIH-1.

4.3.2. Réservoir et histoire naturelle de l'infection à VIH-1

Le réservoir se constitue rapidement dès la primo-infection. Ainsi, on observe une charge virale ADN VIH-1 élevée au cours de la primo-infection (charge médiane de 3,3 log copies/10⁶ PBMCs). Néanmoins il s'agit d'une grande majorité de formes non intégrées, notamment à cause d'une réplication importante du virus à ce stade. A distance de l'infection, on peut observer une légère diminution de la charge ADN VIH-1 total (charge médiane de 2,86 log copies/10⁶ PBMCs à 6-24 mois post-contamination) mais il s'agit davantage de formes intégrées (70,71).

D'autres travaux ont montré une augmentation significative des niveaux d'ADN VIH total et d'ADN VIH intégré en l'absence de traitement antirétroviral. La charge ADN VIH-1 est corrélée à la progression de la maladie. Ainsi, les patients ayant une évolution rapide de l'infection ont des niveaux d'ADN plus élevés en comparaison à ceux qui n'ont pas connu d'évolution de l'infection. Au stade SIDA ou dans les 12 mois précédents, la valeur médiane d'ADN VIH total était de 3,64 log copies/10⁶ PBMCs (59,68).

Chez les patients contrôlant naturellement l'infection (elite controllers), c'est-à-dire qui maintiennent une charge virale négative ou faible en l'absence de traitement, la

quantité d'ADN VIH total est particulièrement faible (charge virale médiane de 1,50 log copies/10⁶ PBMCs) (72).

L'initiation d'un traitement antirétroviral entraîne dans une première phase, une diminution rapide du réservoir mesurée par l'ADN VIH total dans les PBMCs. Cette phase correspond essentiellement à l'élimination des formes d'ADN non intégrées. Elle est suivie d'une seconde phase de cinétique moins rapide. La diminution du réservoir dépend des modalités d'initiation du traitement. La diminution est d'autant plus significative que l'initiation est précoce et la durée du traitement prolongée (59). Ainsi, pour un traitement instauré durant la primo-infection, on a observé par exemple une valeur médiane de 2,3 log copies/10⁶ PBMC après deux ans et 2,15 log après 3,6 ans (73,74).

Chez des patients dont le traitement a été instauré durant la phase chronique, il a été rapporté une médiane de 2,30 log copies/10⁶ PBMC après 5,3 années de et de 2,84 log avec une instauration plus tardive. Au stade SIDA, chez des patients en multi-échec, le niveau du réservoir reste très élevé (médiane : 3,44 log copies/10⁶ PBMC). Chez certains patients ayant été traités très précocement, la réduction importante du réservoir, peut permettre chez une minorité d'obtenir un contrôle à long terme de l'infection, y compris après interruption du traitement. Ces contrôleurs post-traitement ont un réservoir bas (1,71 log copies/10⁶ PBMC en médiane) comme les contrôleurs naturels, mais d'autres mécanismes participent à ce contrôle (59,71).

4.3.3. La quantification du réservoir comme marqueur pronostique

Les données présentées ci-dessus montrent que la mesure de la taille du réservoir du VIH-1 par quantification de l'ADN VIH-1 dans les cellules mononucléées sanguines pourrait être un marqueur pronostique sur l'évolution clinique et immuno-virologique de la maladie.

Ainsi par exemple, la quantification de l'ADN VIH-1 a été démontrée comme un meilleur indicateur de l'évolution vers des stades avancés de la maladie que la quantification de l'ARN plasmatique. Une taille de réservoir élevée est le plus souvent retrouvée chez des patients symptomatiques et est en faveur d'une évolution plus rapide vers un stade SIDA et une immunodépression profonde voire

le décès, que ce soit en phase de primo-infection ou chronique. A l'inverse, un niveau de réservoir faible, est retrouvé chez des patients contrôleurs ou non progressseurs à long terme (75–77).

Avant l'instauration d'un traitement, la mesure des réservoirs permet d'estimer le risque de progression, d'obtention et du maintien d'une suppression virologique sous trithérapie. De même, la mesure du réservoir chez les patients VIH traités, avec une charge virale plasmatique indétectable, permet d'obtenir des informations concernant le niveau de charge virale et le taux de CD4 avant l'instauration de la trithérapie. En effet, chez un patient sous traitement, un niveau de réservoir faible est en faveur d'un traitement commencé très précocement lors de la primo-infection et d'une suppression virologique de longue durée. Chez des patients avec une charge virale indétectable sous traitement, un niveau de réservoir faible avant trithérapie est en faveur de l'absence de charge virale résiduelle. La taille des réservoirs VIH est aussi prédictive du risque de rebond virologique sous traitement (73,78).

D'un point de vue clinique, il a été démontré que chez des patients traités, la gravité des troubles neurocognitifs était en lien avec des niveaux élevés de réservoirs.

De plus, après autogreffe de moelle chez les patients atteints de lymphomes réfractaires liés au VIH, la quantification de l'ADN proviral permettrait de présager une estimation de la survie globale (75).

Plus récemment, la mesure du réservoir a été proposée pour guider l'allègement thérapeutique, en contribuant à l'identification des patients à risque d'échec virologique. Ainsi par exemple, il a été démontré que le niveau des réservoirs était prédictif d'échec virologique lors d'allègement vers une monothérapie à base d'inhibiteur de protéase «boostée» ou de dolutégravir.

La quantification du réservoir est un marqueur incontournable dans la quête d'une rémission/ éradication de l'infection VIH. Les très rares cas de contrôle virologique prolongé après interruption sont caractérisés par un niveau d'ADN VIH très bas (c'est-à-dire inférieur à $2,3 \log \text{ copies}/10^6 \text{ PBMC}$ (48).

4.4. Génotypage sur ADN VIH-1 et intérêt clinique

La recherche de résistance aux antirétroviraux est actuellement recommandée pour les personnes infectées par le VIH-1 dès le diagnostic de l'infection, ainsi qu'au cours du traitement en cas de survenue d'échec virologique. Le test génotypique dans le

plasma, avec recherche de mutations de résistance dans les gènes de la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase, est la méthode habituellement utilisée en routine clinique. Néanmoins, le test génotypique peut être également effectué sur l'ADN VIH-1 proviral (virus archivé dans les cellules), notamment dans les circonstances où il ne peut être réalisé avec succès sur du plasma (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

Les variants résistants qui apparaissent au cours de l'infection VIH-1 peuvent persister dans le réservoir pendant longtemps, malgré un contrôle complet et durable de la charge virale plasmatique. Ainsi, l'ADN VIH-1 archivé dans les cellules pourrait théoriquement mieux refléter la diversité virale et augmenter les chances d'identification de mutations associées à la résistance (79).

Plusieurs études ont évalué les performances du test génotypique de résistance dans l'ADN proviral, en comparaison à celui réalisé dans le plasma, et son utilité a fait l'objet de controverses. Le test génotypique effectué dans l'ADN proviral a montré une bonne corrélation avec le test effectué au niveau de l'ARN plasmatique chez les patients naïfs (80,81), et n'apporte pas d'information additionnelle (82).

Chez les patients traités, une moins bonne sensibilité a été retrouvée pour le génotypage de résistance sur ADN. Ainsi chez des patients traités en échec virologique et toujours sous traitement, il y a plus de mutations de résistance détectées dans l'ARN que dans l'ADN ; néanmoins l'avantage peut être en faveur de l'ADN chez les patients ayant interrompu leur traitement après plusieurs échecs (83). Par ailleurs, chez les patients ayant eu plusieurs génotypes ARN, l'historique (le cumulatif) des génotypes ARN est plus informatif que le génotype ADN (84,85) ; néanmoins des mutations n'ayant jamais été identifiées dans l'ARN peuvent être retrouvées dans l'ADN (86). La perte d'information par le test ADN a été surtout observée chez les patients ayant eu des échecs virologiques préalables (87), ce qui signifie donc que toutes les mutations ne sont pas archivées sur le long-terme.

L'absence de mutation dans l'ADN est peut-être également due à la fluctuation dans l'échantillon et à la limite de détection de la technique utilisée. La présence d'une mutation dans une cellule infectée peut être un événement rare et fluctuer selon la loi de Poisson. De plus, la méthode de génotypage la plus répandue est le séquençage Sanger qui détecte habituellement les variants présents à une prévalence de plus de

20%. Les nouvelles techniques de séquençage haut débit, actuellement déployées dans les laboratoires hospitaliers peuvent contribuer à une meilleure analyse de la sensibilité (88).

Le test génotypique dans l'ADN a également un intérêt particulier dans le contexte de changement de traitement pour allègement, simplification ou intolérance chez des sujets contrôlés avec une charge virale indétectable. Ce test peut être utile au clinicien pour choisir de façon sereine le nouveau traitement, notamment chez les patients sans aucun génotype antérieur ou récent (89).

Le génotypage de résistance dans l'ADN peut également manquer de spécificité notamment par l'identification de mutations de résistance associées à la présence de codons stop ou d'hypermutation. Ces variants correspondent à des virus défectifs et résultent de l'activité des protéines APOBEC3G. La prévalence de séquences ADN avec présence de codons stop ou d'hypermutation a été estimée autour de 6% en routine. Les mutations les plus spécifiquement associées à ce phénomène sont M184I, E138K et M230I dans le gène de la transcriptase inverse, et le polymorphisme G73S dans le gène de la protéase (90).

Mais, à la différence des mutations de résistance présentes dans le plasma chez des patients en échec virologique, l'impact réel de ces mutations archivées sur le maintien de la réponse virologique chez des patients à charge virale contrôlée reste à déterminer.

En conclusion, le génotypage de résistance sur ADN VIH intracellulaire peut aider à documenter les échecs virologiques passés par la mise en évidence de mutations de résistance archivées, chez les patients pour lesquels on ne dispose pas d'un historique médical complet. Cependant, l'interprétation des résultats est délicate et doit faire l'objet d'un dialogue entre clinicien et virologue. Le génotypage de résistance issu de l'étude de l'ADN VIH ne peut en aucun cas remplacer une analyse soigneuse de l'histoire thérapeutique.

Partie II : Étude

1. Objectifs du travail

L'objectif général de ce travail est d'analyser la variabilité des données de génotypage de résistance du VIH-1 dans un même prélèvement.

Plus spécifiquement, il s'agit entre plusieurs échantillons issus du même prélèvement :

- de comparer la quantité d'ADN VIH-1.
- de comparer les mutations de résistance identifiées et leur impact sur l'interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux.
- d'évaluer la variabilité globale des séquences.

2. Matériels et méthodes

2.1. Patients et échantillons

Les patients inclus dans cette étude sont des patients infectés par le VIH-1 pour lesquels une quantification et un génotypage de l'ADN proviral ont été demandés dans le cadre d'un suivi de routine au laboratoire de virologie du CHU de Lille. Il s'agit d'une étude incluant des patients suivis dans le service de maladies infectieuses du CH de Tourcoing et du CH de Lens pour lesquels un échantillon de 5 mL de sang total était disponible. La période de recueil a été étendue du 20/11/2019 au 12/08/2020. Les patients ont été également sélectionnés en fonction de leur charge virale ADN VIH-1. En effet la charge minimale ADN VIH-1 retenue dans le laboratoire pour réaliser un génotypage de résistance est de 200 copies/10⁶ leucocytes, car le risque d'échec au-dessous de cette charge est élevé. De plus, les patients ont été choisis afin de couvrir toute la gamme de charges habituellement rencontrées en routine dans le laboratoire. Une analyse sur les données de quantification ADN VIH-1 a permis de retrouver une valeur médiane de 522 copies/10⁶ leucocytes. Nous avons donc décidé d'inclure la moitié des patients avec une charge ADN VIH-1 initiale < 500 copies/10⁶ leucocytes, et l'autre moitié avec une charge > 500 copies/10⁶ leucocytes.

Les données démographiques et cliniques ont été collectées rétrospectivement à partir de la base de données Nadis®. Tous les sujets ont signé un formulaire de consentement éclairé approuvé par le comité d'éthique de la base de données du dossier électronique des patients de Nadis®. Les prélèvements de sang total EDTA sont aliquotés et conservés à -20°C jusqu'aux analyses.

2.2. Extraction des acides nucléiques cellulaires et quantification de l'ADN total

2.2.1. Extraction des acides nucléiques

L'ADN total cellulaire a été extrait à partir de 1000 µL de sang total EDTA en utilisant la trousse MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume sur l'automate MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le contrôle interne de la PCR quantitative (Biocentric, Bandol, France) a été ajouté à chaque échantillon avant extraction. Brièvement, les cellules ont été lysées et les protéines digérées par ajout du tampon de lyse et de la protéinase K. Les acides nucléiques libérés ont

ensuite adhéré aux billes magnétiques. Les débris cellulaires ont été supprimés par lavages successifs. L'ADN a été séparé des billes magnétiques par addition d'un tampon d'éluat. Le volume de l'éluat était de 100 µL. Du fait d'une rupture du kit d'extraction large volume, 3 échantillons ont été extraits avec la trousse MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, avec une prise d'essai de 400µL et un éluat de 50 µL. Deux extractions ont été réalisées pour chaque échantillon et les éluats poolés.

2.2.2. Quantification de l'ADN total

La concentration en ADN total de chaque éluat a été déterminée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop™ One/One^C. (ThermoFisher). Brièvement, 2 µL d'extrait d'ADN purifié ont été déposés sur le capteur de l'automate, puis une mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm a été effectuée. L'ADN est considéré de bonne qualité si le rapport d'absorbance 260/280 est inférieur à 2. La valeur d'absorbance à 260 nm est multipliée selon la loi de Beer-Lambert par un coefficient d'absorption égal à 50 permettant ainsi d'obtenir une concentration en ADN total en ng/µL (ou µg/mL).

2.2.3. Quantification par PCR en temps réel de l'ADN VIH-1

La quantification de l'ADN cellulaire VIH-1 a été réalisée par PCR en temps réel grâce à la trousse Generic HIV DNA CELL (Biocentric, Bandol, France) issue des recherches de l'ANRS. Les résultats sont exprimés en copies/10⁶ leucocytes. Le seuil de détection est de 50 copies/10⁶ leucocytes. Les principales étapes sont décrites ci-dessous.

- Préparation des échantillons et de la gamme standard

Les extraits d'ADN purifiés ont été dilués dans de l'eau distillée, lorsque cela était nécessaire, pour atteindre la concentration en ADN total requise à 50 ng/µL. Si la concentration était inférieure ou égale à 50 ng/µL, l'extrait pur a été directement utilisé. En parallèle, une gamme étalon en 4 points a été préparée à partir d'un tube de standard à 3x10⁶ copies/mL par dilutions successives à 3x10⁵, 3x10⁴, 3x10³ et 3x10² copies/mL (soit 6000, 600, 60 et 6 copies d'ADN VIH/PCR).

- Préparation du mélange réactionnel

L'enzyme utilisée inclus dans le master mix est une ADN polymérase thermostable pour PCR « hot-start » rapide. Les conditions réactionnelles utilisées pour la PCR sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification.

Réactifs	Volume (µL)
Amorce A : « amorce sens »	1
Amorce B : « amorce anti-sens »	1
Sonde C : « sonde TaqMan® »	1
Mix enzymatique 2X	25
IC DNA mix amorces-sonde	1,5
H2O « nucléase-free »	0,5
Volume total	30µL

Pour la PCR, 30µL de mix sont distribués dans les puits d'une plaque avec ajout de 20 µL d'ADN extrait, de standard ou d'eau « nucléase-free » (témoin négatif) pour un volume total de 50 µL.

- Amplification par PCR en temps réel de l'ADN VIH-1

Cette étape utilise un thermocycleur en temps réel LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le contrôle interne IC DNA est amplifié de façon simultanée à l'ADN VIH-1 grâce à l'utilisation de sondes de détection marquées avec un fluorochrome « reporters » différent, émettant soit dans le canal Cy5 pour l'IC, soit dans le FAM pour l'échantillon.

Les conditions d'amplification pour la réaction de PCR sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Conditions d'amplification pour la réaction de RT-PCR.

Étapes	Température (°C)	Durée	Amplification
	50	2 minutes	
Activation enzymatique	95	10 minutes	
Dénaturation	95	15 secondes	50 cycles
Hybridation	60	1 minute	

- Résultats de la quantification

La quantité (Q) ADN VIH-1 obtenue du thermocycleur est en copies/PCR. La concentration en ADN total des échantillons a été ajustée à 50 µg/mL, ce qui équivaut à 1 µg d'ADN par puits de PCR (volume = 20 µL). On estime que 1 µg d'ADN correspond à 150 000 cellules.

La charge virale (C) en copies d'ADN VIH-1 pour 10⁶ cellules a été calculée à l'aide de la formule suivante : $C=(Q \times 10^6)/150\,000$ (avec C = charge virale ADN VIH-1 en copies/10⁶ cellules Q = Quantité d'ADN VIH-1 en copies/puits PCR).

Le résultat final est donc exprimé en nombre de copies d'ADN VIH-1 pour 10⁶ leucocytes.

2.3. Séquençage de l'ADN VIH-1

Dans ce travail, le séquençage de l'ADN a été effectué grâce à une plateforme commerciale de séquençage de nouvelle génération : la chaîne automatisée Sentosa® (Vela Diagnostics).

La plateforme Sentosa® est constituée de plusieurs instruments dont Sentosa SX101, Sentosa ST401 et Sentosa SQ301, permettant de réaliser une série de séquençage haut débit. Le flux de travail général est composé de plusieurs étapes : extraction et préparation de la PCR, préparation de la librairie, PCR en émulsion, enrichissement et réaction de séquençage sur l'analyseur PGM Ion Torrent (Figure 14). Cette procédure a été optimisée et marquée pour le séquençage à partir d'un échantillon de plasma (avec une extraction ARN). Dans le protocole utilisé pour le séquençage ADN, l'extraction est réalisée à part comme décrit ci-dessus, et les extraits sont ensuite intégrés dans la plate-forme pour la préparation de la plaque de PCR.

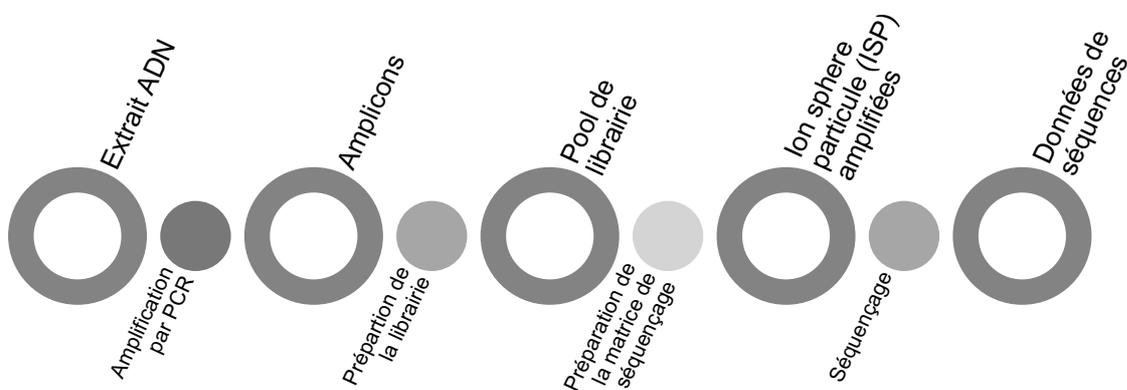


Figure 14 : Flux de travail général du séquençage haut débit.

2.3.1. PCR : Préparation et amplification

La préparation de la PCR est réalisée sur le robot SX 101 pré-PCR (celui utilisé normalement pour extraction d'ARN à partir du plasma). Dans le protocole de séquençage de l'ADN proviral, 60 µL d'ADN déjà extrait sont transféré dans un tube et placé sur le portoir d'élution de l'instrument. Un programme spécial pour l'ADN permet de sauter l'étape d'extraction et l'automate va distribuer directement l'extrait dans la plaque de PCR. La plaque PCR *Sentosa SQ HIV Genotyping Reagent Plate* contient déjà le mix (amorces spécifiques), avec un volume final de réaction de 25 µL. L'étape d'amplification est réalisée sur le thermocycleur Veriti DX. Les échantillons d'ADN ne subissent pas l'étape de RT-PCR et sont soumis directement à une réaction de PCR selon le programme ci-dessous (Tableau 3) :

Tableau 3 : Programme PCR embarqué sur Thermocycleur VERITI DX.

Étape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Synthèse d'ADN	25	2 minutes	1
	50	15 minutes	
Dénaturation	94	2 minutes	50
	94	15 secondes	
Cycle d'amplification PCR 1	58	15 secondes	
	57	15 secondes	
	56	15 secondes	
	55	15 secondes	
	54	15 secondes	
	53	15 secondes	
Extension finale	68	2 minutes	1
	68	1 minute	
Maintient	10	∞	1

Les étapes suivantes ont été effectuées de la même manière que pour les échantillons d'ARN. La PCR est suivie d'un traitement UDG (Uracil-DNA glycosylase) permettant de dégrader les produits non spécifiques mal amorcés et ainsi d'éviter les contaminations. La PCR permet l'amplification des gènes qui codent pour les enzymes virales, cibles des traitements antirétroviraux. Quatre amorces ont été utilisées pour générer deux amplicons différents : l'amplicon « protéase + RT » et l'amplicon « intégrase » (Figure 15).

2.3.2. Préparation de la matrice de séquençage par amplification clonale

2.3.2.1. PCR Émulsion

La PCR en émulsion a été effectuée sur l'automate SX 401i. Le principe de cette PCR est de créer une émulsion huile/milieu aqueux afin d'obtenir des gouttelettes aqueuses contenant l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction de PCR. Ainsi, dans une situation idéale, un fragment d'ADN à séquencer comportant des adaptateurs A et P1 va être mis en contact avec une bille de capture Ion Sphere Particules (ISP) et des amorces A et P1. Ces milliards de microréacteurs vont être soumis à des cycles thermiques et permettre l'individualisation de chaque réaction de PCR.

Les conditions du mélange d'amplification sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification clonale.

Réactifs	Volume (µL)
Reagent Mix	500
Réactif B	300
H2O « DNA/Rnase free »	37
Mélange d'enzyme	50
Billes ISP	100
Contrôle post-libraire CF-1	5
Pool de librairie	8
Volume total = 1000 µL	

Le mélange réactionnel nécessaire à l'amplification clonale a ensuite été chargé dans le puits de la cartouche d'émulsion. La cartouche d'émulsion contenant le mélange huile/milieu aqueux a été ensuite soigneusement disposée sur l'instrument SX 401i pour lancer la PCR en émulsion.

L'amplification clonale commence par l'hybridation d'une amorce A et d'une amorce P1 respectivement aux adaptateurs A et P1 du fragment d'ADN. L'amorce A contient une biotine à son extrémité et va permettre l'amorçage de l'élongation du fragment

d'ADN. L'amorce P1 est composée d'une séquence complémentaire de la séquence B des billes ISP permettant ainsi aux amplicons d'ADN de s'attacher aux ISP. L'unique fragment d'ADN fixé à la bille de capture va pouvoir s'amplifier. Après plusieurs cycles de PCR, la bille va être recouverte de plusieurs millions d'ADN simples brins identiques. Cette étape est nécessaire pour atteindre un seuil de détection du signal suffisant au moment du séquençage. Un microréacteur monoclonal est la situation optimale pour le séquençage ; cependant d'autres situations sont possibles et peuvent perturber le séquençage : microréacteur polyclonal, multi-ISP ou encore non clonal. Ces données « parasites » sont filtrées lors de la primo-analyse. L'étape d'amplification clonale est schématisée sur l'annexe 2.

2.3.2.2. Enrichissement par isolement des billes ISP

L'étape d'enrichissement est réalisée sur l'automate ST401e. Cette étape d'enrichissement permet de sélectionner les billes ISP ayant fixé les amplicons (Voir annexe 2). Les culots de billes ISP recouvertes de fragments d'ADN simples brins ont été récupérés après avoir retiré le surnageant.

Les billes magnétiques ES recouvertes de streptavidine sont ajoutées à la solution d'ISP/ADN. Une liaison fragment d'ADN-biotine/streptavidine s'effectue permettant ainsi de retenir uniquement les billes ISP ayant fixé de l'ADN grâce à un aimant. Les billes non clonales vont être éliminées par trois lavages successifs.

2.3.3. Réaction de séquençage

Le séquençage des échantillons s'effectue sur l'automate Sentosa® SQ301 (Ion PGM DX) en utilisant le kit de séquençage Sentosa® SQ (200 bp) et la puce Sentosa® SQ 318.

2.3.3.1. Chargement de la puce

Le chargement de la puce est une étape critique. Pour la préparation de l'échantillon, 15 µL du culot du tube contenant les ISP amplifiées récupérées après centrifugation et 12 µL d'amorces SEQ ont été incubés dans le thermocycleur Veriti DX 96-Well Thermocycler pour permettre l'hybridation des amorces de séquençage sur les fragments d'ADN suivant le programme ci-après : 95°C pendant 2 min, 37°C pendant 2 min puis 25°C.

Le tube a été ensuite incubé à température ambiante avec 3 µL d'enzyme SEQ pendant 5 minutes. L'échantillon a été déposé sur la puce qui est centrifugée plusieurs fois pour retirer le liquide en excès et pour bien distribuer unitairement les billes ISP chargées dans les puits. Le séquençage est lancé automatiquement après le chargement de la puce dans le séquenceur.

2.3.3.2. Séquençage sur PGM Ion Torrent

La technique Ion-Torrent utilise la méthode de séquençage par synthèse. Les quatre nucléotides A, T, G et C vont être apportés alternativement par cycle. Toutes les 15 secondes, ils vont successivement inonder la puce semi-conductrice. Lors de l'incorporation d'un nucléotide dans un brin d'ADN simple brin par l'ADN polymérase, un proton H⁺ est libéré. Cette libération va entraîner un changement de pH du milieu réactionnel et donc du voltage qui est enregistré au niveau de la puce. Le signal électrique ainsi créé est proportionnel au nombre de bases incorporées lors d'un flow. Cette information est ensuite convertie en données brutes sous forme d'ionogramme puis en données de séquences. La détermination de la séquence se fait simultanément sur un très grand nombre de fragments amplifiés. Le séquençage dure environ 4,5 h.

2.3.4. Analyse des données et contrôle de qualité

Une analyse primaire des données est réalisée sur le serveur du SQ 301, suivie d'une analyse secondaire avec le logiciel SQ reporter (contrôle qualité et alignement). Le contrôle qualité comporte des éléments généraux comme le pourcentage de puits dans la puce avec une bille ISP valide, le nombre de reads avec un adaptateur valide, mais surtout la validité du système contrôle et de l'échantillon. Le système contrôle comprend la qualité de l'amplification et du séquençage du contrôle avec notamment la couverture et la fréquence des 3 mutations (contrôle positif), et la quantité maximale de reads du VIH-1 dans le contrôle (contrôle négatif). Après vérification des critères de qualité du système contrôle, la qualité du séquençage de chaque échantillon est vérifiée. Ainsi le logiciel SQ reporter permet d'évaluer la couverture et qualité de la distribution avec le Phred score (< 20 = mauvaise qualité ; (entre 20 et 28 = qualité moyenne et > 28 = bonne qualité). Le nombre total de reads et le nombre médian de reads par position nucléotidique sont indiqués pour chaque amplicon, avec une représentation graphique qui permet de visualiser la couverture au niveau de chaque position. Le

logiciel SQ reporter n'est pas utilisé pour l'identification des mutations de résistance, car il ne permet pas un choix du seuil, et l'algorithme de l'ANRS n'est pas mis à jour. Ainsi pour l'analyse des variants, les fichiers FastQ sont transférés vers le logiciel ASP-IDNS-5 ® (SmartGene, Zug, Suisse) après élimination des reads de mauvaise qualité.

2.4. Identification des mutations et interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux

Le programme utilisé dans le logiciel ASP-IDNS-5 ® est le Provirus pipeline version 2.0.5_HIV-1. Ce logiciel permet une identification automatisée des mutations de résistance au niveau des différentes régions, selon l'algorithme de l'ANRS en vigueur. Les éléments importants comme les mutations, les codons stop sont présentés d'une manière quantitative (en pourcentage de reads alignés). L'interprétation de la sensibilité aux antirétroviraux a été réalisée également selon l'algorithme de l'ANRS v30 (Novembre 2019), avec un seuil à 20% et 10% pour un minimum de couverture de 50 reads.

2.5. Analyse phylogénétique

L'analyse a été réalisée avec le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7. Un arbre phylogénétique a été construit pour chaque région : transcriptase inverse, protéase et intégrase. Les alignements multiples des séquences nucléotidiques ont été réalisés en utilisant l'algorithme de Clustal W. A partir de cette matrice, l'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance (basée sur l'algorithme de Tamura-Nei-Model). La séquence de référence du VIH HXB-2 (GenBank) a été introduite pour chacune des 3 régions.

2.6. Analyse statistique

Les données quantitatives ont été présentées sous forme de médiane et interquartiles (IQR) ou de moyenne et écart-type, et les données qualitatives sous forme de pourcentage. La variabilité des données quantitatives entre plusieurs échantillons a été évaluée avec le coefficient de variation. Les comparaisons ont été réalisées avec le test t de Student en utilisant le logiciel QuickCalcs (www.graphpad.com). Un seuil de 5% a été considéré significatif.

3. Résultats

3.1. Patients et échantillons

Au total 60 échantillons provenant de 12 patients ont été analysés à raison de 5 échantillons par patient. Pour chaque patient, les 5 échantillons sont issus du même prélèvement. Les caractéristiques des patients sont présentées dans le tableau 5.

Les patients inclus dans ce travail sont majoritairement des hommes (92%). L'âge médian, au moment du prélèvement, était de 45 [36,5 ; 50,25] ans. Les prélèvements ont été réalisés dans un délai médian de 11 [7,75 ; 20,25] ans après le diagnostic du VIH. La charge virale plasmatique en VIH-1 était indétectable pour la majorité des patients (10 patients), à l'exception de deux patients (patient 8 et 9) qui avaient une charge virale à 126 et à 63 copies/mL respectivement. La charge virale médiane en ADN total en VIH-1 était de 500 [324,75 ; 645,5] copies/10⁶ leucocytes au moment du prélèvement, avec des extrêmes de 288 et 1853 copies/10⁶ leucocytes. La moitié des échantillons se trouvait de part et d'autre de la médiane. Les taux médians de lymphocytes TCD4+ et TCD8+ étaient respectivement de 643 [356,5 ; 954,5] et 754 [614 ; 931,25] cellules/mL, avec un ratio à CD4/CD8 médian à 0,74 [0,47 ; 1,20].

Tous les patients étaient sous trithérapie antirétrovirale au moment de l'étude, avec un nombre médian de 4 [2,75 ; 6] lignes de traitement et le temps médian écoulé depuis l'instauration du traitement était en médiane de 8 [0 ; 12,75] ans. Le sous-type majoritaire est le sous type B (10 patients), les 2 autres sous types étant A et CRF02_AG.

Tableau 5 : Caractéristiques des patients.

Patient	Age (an)	Sexe	Sous type	Temps écoulé depuis le diagnostic VIH+ (an)	CV plasmatique VIH-1 (copies/mL)	CV ADN total VIH-1 (copies/10 ⁶ cellules)	Taux de CD4 (cellules/mL)	Taux de CD8 (cellules/mL)	Traité (O/N)	Temps écoulé depuis l'initiation du traitement (an)	Nombre de lignes de traitement
1	55	M	B	25	< 20	288	1299	2005	O	23	11
2	44	M	B	04	< 20	296	246	615	O	04	4
3	32	M	B	11	< 20	300	959	918	O	00	1
4	20	M	A	20	< 20	333	89	971	O	00	1
5	51	M	B	11	< 20	545	648	460	O	09	3
6	47	M	B	21	< 20	731	953	766	O	21	6
7	48	M	B	08	< 20	487	971	819	O	08	4
8	50	F	CRF02_AG	07	63	513	638	522	O	07	6
9	66	M	B	21	126	1853	268	685	O	21	17
10	35	M	B	11	< 20	443	386	611	O	08	3
11	37	M	B	03	< 20	1042	618	742	O	02	2
12	44	M	B	10	< 20	617	930	1892	O	10	3

3.2. Évaluation de la charge virale en ADN VIH-1 total

3.2.1. Quantification de l'ADN total au Nanodrop

Les données de quantification de l'ADN total en ng/μL des 5 passages pour chaque patient de l'étude sont décrites dans le tableau 6. Lorsqu'on prend en compte les 12 patients de la cohorte le coefficient de variation (CV) représentant les fluctuations entre différents échantillons d'un même prélèvement oscillait entre 11% à 62%. Le CV moyen pour les prélèvements avec une charge virale ADN VIH initiale < 500 copies/10⁶ leucocytes était de 32,2% contre 19,5% pour ceux avec une charge virale > 500 copies/ 10⁶ leucocytes (p= 0.18).

Tableau 6 : Quantification de l'ADN total en ng/μL (ou μg/mL).

	Moyenne	Écart type	CV (%)
Patient 1	120	74	62
Patient 2	109	18	16
Patient 3	89	25	29
Patient 4	120	37	31
Patient 5	116	17	15
Patient 6	120	17	14
Patient 7	211	82	39
Patient 8	32	5	17
Patient 9	137	62	45
Patient 10	71	11	16
Patient 11	108	17	15
Patient 12	66	7	11

3.2.2. Quantification par RT-PCR de l'ADN VIH-1

Les résultats de quantification de l'ADN VIH total par RT-PCR sont représentés dans le tableau 7. Les mesures en ADN VIH des échantillons associés à un même prélèvement étaient relativement constantes pour la plupart, avec des CV allant de 23% à 89%. Lorsqu'on compare la variabilité des 6 patients avec une charge virale initiale < 500 copies/10⁶ leucocytes à celle des 6 patients > 500 copies/10⁶ leucocytes, on retrouve des CV similaires qui sont respectivement de 48 % et 42% (p=0.58).

Tableau 7 : Quantification par RT-PCR de l'ADN VIH-1 en copies/10⁶ cellules.

	Moyenne	Écart type	CV (%)
Patient 1	116	54	46
Patient 2	215	48	23
Patient 3	217	97	45
Patient 4	520	460	89
Patient 5	331	120	36
Patient 6	1763	667	38
Patient 7	180	100	56
Patient 8	291	100	35
Patient 9	2619	1500	57
Patient 10	85	25	29
Patient 11	846	446	53
Patient 12	192	64	33

3.3. Séquences

Sur les 60 échantillons testés, un séquençage optimal a été obtenu pour 49 échantillons. Parmi les 11 autres échantillons, 2 n'ont pas obtenu une couverture suffisante sur l'ensemble des trois régions : RT, PR et IN ; les 9 autres étaient en échec sur une ou deux régions uniquement.

Deux indicateurs ont été analysés pour les séquences : le nombre total de reads et la couverture médiane par position nucléotidique.

Le nombre total moyen de reads pour les échantillons de chaque patient est détaillé dans le tableau 8. Ce nombre varie fortement entre les patients, mais aussi entre les passages d'un même patient. Ainsi le CV pour un même patient variait entre 15 et 206% pour la région PR/RT et entre 23 et 101% pour la région IN. Le CV moyen pour un même patient était de 109,2% pour les 6 patients dont la charge virale ADN VIH initiale était < 500 copies/10⁶ leucocytes et de 76,7% pour les 6 autres (p=0,29) pour la région RT/PR. En ce qui concerne la région IN, le CV moyen était respectivement de 57,5% et 57,2% pour les deux groupes (p=0,98).

Tableau 8 : Nombre total de reads des séquences analysées.

	RT/PR			IN		
	Moyenne	Écart type	CV (%)	Moyenne	Écart type	CV (%)
Patient 1	14477	16345	113	21490	10920	51
Patient 2	4845	4270	88	26203	18041	69
Patient 3	18005	37121	206	12947	8932	69
Patient 4	52468	59168	113	24216	12532	52
Patient 5	19156	27868	145	12891	13072	101
Patient 6	35929	23076	64	36343	24289	67
Patient 7	18489	16115	87	15774	7679	49
Patient 8	6297	3392	54	15020	5632	37
Patient 9	46340	27571	59	25707	5926	23
Patient 10	22720	10943	48	14955	8294	55
Patient 11	34237	41997	123	25099	16376	65
Patient 12	82904	12423	15	33282	16611	50

Les données de couverture médiane pour l'ensemble des échantillons des 12 patients sont présentées dans le tableau 9. Le CV entre différents échantillons d'un même prélèvement variait entre 17 et 161% pour la région RT/PR et entre 21 et 166% pour la région IN. Le CV moyen au sein des groupes à faible et forte charge virale ADN VIH était respectivement de 104 et 76.3% ($p= 0.29$) pour la région RT/PR. Ces valeurs étaient de 76,3 versus 54,8% ($p= 0,35$) pour la région IN.

Tableau 9 : Couverture médiane des séquences analysées.

	RT/PR			IN		
	Moyenne	Écart type	CV (%)	Moyenne	Écart type	CV (%)
Patient 1	1655	1925	116	3227	1772	55
Patient 2	593	526	89	3873	2682	69
Patient 3	3736	6001	161	1847	1289	70
Patient 4	6080	7399	122	3372	1740	52
Patient 5	2187	3237	148	1884	1963	104
Patient 6	4353	3058	70	5354	3070	57
Patient 7	2336	2022	87	2304	1058	46
Patient 8	700	357	51	1981	696	35
Patient 9	6088	3701	61	4198	901	21
Patient 10	2404	1182	49	9556	15857	166
Patient 11	4128	4573	111	4076	2560	63
Patient 12	9368	1636	17	5142	2527	49

3.4. Mutations de résistance

3.4.1. Identification des mutations de résistance à 20%

Les résultats du séquençage des différents échantillons sont présentés ci-dessous avec un seuil à 20% qui est celui utilisé en routine, et considéré comme équivalent à la technique Sanger. Sur les douze patients, et en considérant l'ensemble des échantillons passés, 8, 11 et 5 patients avaient au moins une mutation de résistance au niveau du gène de transcriptase inverse (TI), de la protéase et de l'intégrase respectivement. Le détail des mutations est présenté dans les tableaux : 10a-l.

Lorsqu'on s'intéresse aux différents échantillons de chaque patient, des discordances peuvent parfois s'observer.

Ainsi au niveau du gène de la TI, des différences ont été notées pour 5 patients (1, 4, 5, 10 et 12). Pour le patient 1, l'insertion 69 a été observée sur 2 échantillons et était absente sur les autres malgré une couverture optimale à cette position. Les mutations M184V et T69S ont également été identifiées sur 3 échantillons sur les 5 séquencés. Pour le patient 4, la mutation de résistance Y181I a été relevée sur seulement 2 échantillons sur 4. Concernant le patient 5, les mutations M184I et M230I ont été identifiées toutes les deux sur 2 échantillons sur 5. Pour le patient 10, ce sont également les mutations M184I et M230I qui ont été observées sur 1

échantillon sur 3. Enfin, pour le patient 12, la mutation de résistance D67N a été retrouvée uniquement sur un échantillon.

Au niveau du gène de la protéase, des discordances ont été relevées pour 3 patients, (2, 3 et 10). Pour le patient 2, la mutation de résistance H69Y a été observée sur seulement 1 échantillon sur les 4 analysés avec une couverture suffisante. En ce qui concerne, le patient 3, la mutation M46I a été retrouvée uniquement sur 1 échantillon et était absente des 2 échantillons avec une couverture optimale restants. Enfin, pour le patient 10, la mutation M36I et la mutation M46L ont chacune été identifiées sur 1 échantillon.

Au niveau du gène de l'intégrase, des différences ont également été notées pour les 3 patients suivants, les patients (1, 2 et 3). Pour le patient 1, la mutation L74M était absente sur 1 échantillon sur 5 et la mutation L74I était au contraire présente sur 2 échantillons sur 5. Pour le patient 2, les mutations T97A et F121Y sont apparues respectivement sur 2 et 1 échantillons sur 5. Enfin, pour le patient 3, la mutation de résistance E138K a été retrouvée sur uniquement 1 échantillon sur 5.

Tableau 10 : Mutations observées

Tableau 10-a) Mutations du patient 1 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	41L, 215Y	63P, 69Y	74M
2	69insert, 184V, 41L, 215Y, 69S	63P, 69Y	74M
3	69insert, 41L, 215Y, 69S	63P, 69Y	74I
4	184V, 41L, 215Y, 69S	63P, 69Y	74M, 74I
5	184V, 41L, 215Y	63P, 69Y	74M

* couverture insuffisante

0 : absence de mutation de résistance

Les mutations de résistance discordantes sont en bleu.

Tableau 10-b) Mutations du patient 2 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	101R,179I	71T, 63P	97A
2	101R,179I	71T, 63P,69Y	0
3	*	*	0
4	101R,179I	71T, 63P	97A
5	101R,179I	71T, 63P	121Y

Tableau 10-c) Mutations du patient 3 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	*	0
2	0	71V,36I	0
3	0	71V,36I	138K
4	0	46I, 71V, 36I	0
5	0	*	0

Tableau 10 -d) Mutations du patient 4 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 181I, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
2	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
3	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
4	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 181I, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
5	*	*	*

Tableau 10-e) Mutations du patient 5 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	184I, 90I, 179I, 230I	63P, 36I	0
2	90I, 179I	63P, 36I	0
3	90I, 179I	63P, 36I	0
4	184I, 90I, 179I, 230I	63P, 36I	0
5	90I, 179I	63P, 36I	0

Tableau 10-f) Mutations du patient 6 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0

Tableau 10-g) Mutations du patient 7 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	90I	10I, 60E	0
2	90I	10I, 60E	0
3	90I	10I, 60E	0
4	90I	10I, 60E	0
5	90I	10I, 60E	0

Tableau 10-h) Mutations du patient 8 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	36I, 69K, 89M	74I
2	*	*	*
3	0	36I, 69K, 89M	74I
4	0	36I, 69K, 89M	74I
5	0	36I, 69K, 89M	74I

Tableau 10-i) Mutations du patient 9 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	184V, 138A	90M, 63P	74I
2	184V, 138A	90M, 63P	74I
3	184V, 138A	90M, 63P	74I
4	184V, 138A	90M, 63P	74I
5	184V, 138A	90M, 63P	74I

Tableau 10-j) Mutations du patient 10 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	*	*	0
2	98S	10I, 63P	*
3	184I, 98S, 230I	10I, 63P, 36I	0
4	*	*	0
5	98S	10I, 63P, 46L	0

Tableau 10-k) Mutations du patient 11 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	71T, 63P	0
2	0	71T, 63P	0
3	0	71T, 63P	0
4	0	71T, 63P	*
5	0	71T, 63P	0

Tableau 10-l) Mutations du patient 12 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	67N , 138A	60E, 71V, 63P	0
2	*	*	0
3	138A	60E, 71V, 63P	0
4	138A	60E, 71V, 63P	0
5	*	*	0

3.4.2. Interprétation des mutations de résistance à 20%

L'interprétation de la sensibilité du virus aux principaux antirétroviraux est présentée dans les tableaux 11a-l en utilisant l'algorithme de l'ANRS version 30 (Novembre 2019).

De façon générale, peu de résistances ont été observées. Ainsi en prenant en compte l'ensemble des échantillons, seulement 4, 6, 6 et 2 patients avaient une résistance à au moins une molécule de la classe des INTI, INNTI, IP et INI respectivement. Néanmoins, les discordances de mutations observées entre les échantillons de certains patients ont entraîné des différences d'interprétation.

Ainsi, au niveau de la classe des INTI, des différences d'interprétation ont été retrouvées pour les patients 1, 5 et 10. Pour le patient 1, la 3TC/FTC et l'ABC ont été interprétés résistants pour 4 échantillons sur 5, l'échantillon restant a été rendu sensible à la 3TC/FTC et intermédiaire à l'ABC (absence de mutation M184V et d'anomalie en position 69). Le virus a été rendu sensible ou intermédiaire au TDF/TAF pour les 3 échantillons qui ne présentaient pas l'insertion 69. Pour le patient 5, 2 échantillons sur 5 ont été rendus résistants à la 3TC/FTC et intermédiaire à l'ABC du fait de la présence de la mutation M184I sur ces 2 échantillons. De façon similaire, pour le patient 10, la mutation M184I a entraîné pour un échantillon une

interprétation en virus résistant et intermédiaire respectivement à la 3TC/FTC et à l'ABC.

Dans la classe des INNTI, 3 patients (patient 4, 5 et 10) ont présenté des différences d'interprétation entre les passages, parmi les 5 patients pour lesquels des mutations de résistance avaient été observées. Pour le patient 4, la présence de la mutation Y181I a entraîné une résistance additionnelle à l'ETR et à la RPV pour 2 échantillons, en plus de la K103N qui avait déjà atteint la DOR, la NVP et l'EFV pour l'ensemble des échantillons. Pour le patient 5, 2 échantillons ont été rendus « résistant » à la RPV du fait de la présence de la mutation M230I. De même, pour le patient 10, 1 échantillon sur 3 possédait la mutation M230I à l'origine d'une résistance du virus à la RPV.

Au niveau des IP, parmi les 5 patients présentant des mutations de résistance, une différence d'interprétation a été retrouvée pour seulement 2 patients (patient 3 et 10) car la plupart des mutations observées étaient des mutations mineures. De plus, il ne s'agissait pas d'une différence significative : passage de sensible à intermédiaire à l'ATV/RTV pour un seul échantillon, du fait de l'apparition d'une troisième mutation mineure pour le patient 3. Quant au patient 10, 1 échantillon a été rendu intermédiaire à l'ATV/RTV par l'addition de la mutation M46L à la L10I présente également sur les 2 autres échantillons, et à la LPV par la présence de l'association des 3 mutations suivantes : L10I, M46L et L63P.

En ce qui concerne les INI, des discordances ont été retrouvées pour 2 patients (patients 2 et 3). Ainsi, pour le patient 2, la présence de la mutation F121Y a entraîné une résistance à l'ensemble des molécules de la classe. De plus, la présence de la mutation T97A sur 2 autres échantillons a entraîné une résistance isolée à l'EVG. Quant au patient 3, la mutation E138K observée sur un seul échantillon, a entraîné une résistance à l'EVG, le DTG QD, le BIC et le CAB.

Tableau 11 : Interprétation des mutations de résistance.

Tableau 11-a) Interprétation des mutations patient 1 :

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC	Vert	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge
ABC	Jaune	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge
TDF_TAF	Vert	Rouge	Rouge	Jaune	Vert
ZDV	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
EFV	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
ETR	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
NVP	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
RPV	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
DRV_RTV_BID	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
DRV_RTV_QD	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
LPVr	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
TPV_RTV	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
DTG_BID	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
DTG_QD	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
EVG	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
RAL	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert

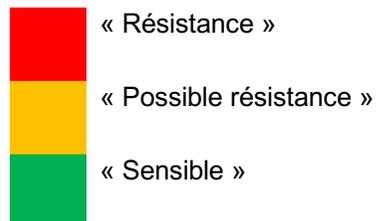


Tableau 11–b) Interprétation des mutations patient 2.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC	■		*	■	
ABC	■		*	■	
TDF_TAF	■		*	■	
ZDV	■		*	■	

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	■		*	■	
DRV_RTV_BID	■		*	■	
DRV_RTV_QD	■		*	■	
LPVr	■		*	■	
TPV_RTV	■		*	■	

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR	■		*	■	
EFV	■		*	■	
ETR	■		*	■	
NVP	■		*	■	
RPV	■		*	■	

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB	■				■
DTG_BID	■				■
DTG_QD	■				■
EVG	■	■			■
RAL	■	■			■

Tableau 11–c) Interprétation des mutations patient 3.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC					
ABC					
TDF_TAF					
ZDV					

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR					
EFV					
ETR					
NVP					
RPV					

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	*				*
DRV_RTV_BID	*				*
DRV_RTV_QD	*				*
LPVr	*				*
TPV_RTV	*				*

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB					
DTG_BID					
DTG_QD					
EVG					
RAL					

Tableau 11–d) Interprétation des mutations patient 4.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI						
Molécules	Échantillons					
	1	2	3	4	5	
3TC/FTC						*
ABC						*
TDF_TAF						*
ZDV						*

Inhibiteurs de protéase						
Molécules	Échantillons					
	1	2	3	4	5	
ATV_RTV						*
DRV_RTV_BID						*
DRV_RTV_QD						*
LPVr						*
TPV_RTV						*

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI								
Molécules	Échantillons							
	1	2	3	4	5			
DOR						*		
EFV						*		
ETR								*
NVP						*		
RPV								*

Inhibiteur de l'intégrase						
Molécules	Échantillons					
	1	2	3	4	5	
BIC/CAB						*
DTG_BID						*
DTG_QD						*
EVG						*
RAL						*

Tableau 11– e) Interprétation des mutations patient 5.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC	Red	Green	Green	Red	Green
ABC	Yellow	Green	Green	Yellow	Green
TDF_TAF	Green	Green	Green	Green	Green
ZDV	Green	Green	Green	Green	Green

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR	Green	Green	Green	Green	Green
EFV	Green	Green	Green	Green	Green
ETR	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
NVP	Green	Green	Green	Green	Green
RPV	Red	Green	Green	Red	Green

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	Green	Green	Green	Green	Green
DRV_RTV_BID	Green	Green	Green	Green	Green
DRV_RTV_QD	Green	Green	Green	Green	Green
LPVr	Green	Green	Green	Green	Green
TPV_RTV	Green	Green	Green	Green	Green

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB	Green	Green	Green	Green	Green
DTG_BID	Green	Green	Green	Green	Green
DTG_QD	Green	Green	Green	Green	Green
EVG	Green	Green	Green	Green	Green
RAL	Green	Green	Green	Green	Green

Tableau 11– f) Interprétation des mutations patient 6.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC					
ABC					
TDF_TAF					
ZDV					

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR					
EFV					
ETR					
NVP					
RPV					

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV					
DRV_RTV_BID					
DRV_RTV_QD					
LPVr					
TPV_RTV					

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB					
DTG_BID					
DTG_QD					
EVG					
RAL					

Tableau 11–g) Interprétation des mutations patient 7.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC					
ABC					
TDF_TAF					
ZDV					

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR					
EFV					
ETR					
NVP					
RPV					

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV					
DRV_RTV_BID					
DRV_RTV_QD					
LPVr					
TPV_RTV					

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB					
DTG_BID					
DTG_QD					
EVG					
RAL					

Tableau 11–h) Interprétation des mutations patient 8.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC		*			
ABC		*			
TDF_TAF		*			
ZDV		*			

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR		*			
EFV		*			
ETR		*			
NVP		*			
RPV		*			

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV		*			
DRV_RTV_BID		*			
DRV_RTV_QD		*			
LPVr		*			
TPV_RTV		*			

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB		*			
DTG_BID		*			
DTG_QD		*			
EVG		*			
RAL		*			

Tableau 11– i) Interprétation des mutations patient 9.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC					
ABC					
TDF_TAF					
ZDV					

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV					
DRV_RTV_BID					
DRV_RTV_QD					
LPVr					
TPV_RTV					

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR					
EFV					
ETR					
NVP					
RPV					

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB					
DTG_BID					
DTG_QD					
EVG					
RAL					

Tableau 11– j) Interprétation des mutations patient 10.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC	*	■	■	*	■
ABC	*	■	■	*	■
TDF_TAF	*	■	■	*	■
ZDV	*	■	■	*	■

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	*	■	■	*	■
DRV_RTV_BID	*	■	■	*	■
DRV_RTV_QD	*	■	■	*	■
LPVr	*	■	■	*	■
TPV_RTV	*	■	■	*	■

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR	*	■	■	*	■
EFV	*	■	■	*	■
ETR	*	■	■	*	■
NVP	*	■	■	*	■
RPV	*	■	■	*	■

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB	■	*	■	■	■
DTG_BID	■	*	■	■	■
DTG_QD	■	*	■	■	■
EVG	■	*	■	■	■
RAL	■	*	■	■	■

Tableau 11–k) Interprétation des mutations patient 11.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC					
ABC					
TDF_TAF					
ZDV					

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR					
EFV					
ETR					
NVP					
RPV					

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV					
DRV_RTV_BID					
DRV_RTV_QD					
LPVr					
TPV_RTV					

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB				*	
DTG_BID				*	
DTG_QD				*	
EVG				*	
RAL				*	

Tableau 11– I) Interprétation des mutations patient 12.

Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
3TC/FTC	■	*	■	■	*
ABC	■	*	■	■	*
TDF_TAF	■	*	■	■	*
ZDV	■	*	■	■	*

Inhibiteurs de protéase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
ATV_RTV	■	*	■	■	*
DRV_RTV_BID	■	*	■	■	*
DRV_RTV_QD	■	*	■	■	*
LPVr	■	*	■	■	*
TPV_RTV	■	*	■	■	*

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
DOR	■	*	■	■	*
EFV	■	*	■	■	*
ETR	■	*	■	■	*
NVP	■	*	■	■	*
RPV	■	*	■	■	*

Inhibiteur de l'intégrase					
Molécules	Échantillons				
	1	2	3	4	5
BIC/CAB	■	■	■	■	■
DTG_BID	■	■	■	■	■
DTG_QD	■	■	■	■	■
EVG	■	■	■	■	■
RAL	■	■	■	■	■

3.4.3. Identification des mutations de résistance au seuil de 10%

Afin d'analyser si les discordances observées sont liées au seuil de 20%, nous avons réalisé une analyse à 10%. Les mutations identifiées sont présentées ci-dessous dans les tableaux 12a-l.

Lorsque le seuil passe de 20% à 10%, 28 mutations supplémentaires ont été identifiées. Les nouvelles mutations sont principalement observées au niveau de la région de la TI et de la protéase avec respectivement un total de 16 et de 9. Seulement 3 nouvelles mutations ont été observées au niveau de l'intégrase.

Au niveau du gène de la transcriptase inverse, l'identification de nouvelles mutations chez 7 patients (patient 1, 2, 4, 5, 9, 10 et 11) n'améliore pas les différences entre les échantillons pour la majorité des patients. Pour le patient 1, la mutation M184V et l'insertion 69 qui étaient déjà présentes, ont été observées sur un nouvel échantillon. Cependant, la mutation M230I absente à 20%, est présente sur 1 seul échantillon sur 5. Pour le patient 4, seule la mutation Y181I était connue parmi les 4 nouvelles mutations. Les mutations M230I et M184I étaient également déjà observées à 20% pour le patient 5, de même que la mutation M230I pour le patient 10. Pour les patients 2, 9 et 11, il s'agit uniquement de nouvelles mutations.

Au niveau du gène de la protéase, de nouvelles mutations ont été retrouvées pour 4 patients (patient 1, 2, 9 et 11). Dans tous les cas, il s'agit de mutations non identifiées auparavant pour chacun des échantillons et dont la présence n'améliore pas les discordances observées entre les échantillons au seuil de 20%.

Au niveau du gène de l'intégrase, de nouvelles mutations ont été observées pour les patients 1, 2 et 11. Les mutations L74I et T97A apparaissent respectivement pour les patients 1 et 2, sur 1 échantillon supplémentaire. Dans les deux cas ces mutations étaient déjà présentes sur deux autres échantillons, et leur détection améliore donc la reproductibilité. Pour le patient 11 au contraire, la mutation E138K observée sur 1 échantillon n'était pas présente et augmente la variabilité entre les échantillons.

Tableau 12 : Nouvelles mutations observées

Tableau 12-a) Nouvelles mutations du patient 1 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	184V , 41L, 215Y	63P, 69Y	74I , 74M
2	69insert, 184V, 41L, 215Y, 69S	63P, 69Y	74M
3	69insert, 41L, 215Y, 69S	63P, 69Y	74I
4	69insert , 184V, 41L, 215Y, 69S, 230I	88S , 63P, 69Y	74M, 74I
5	184V, 41L, 215Y	63P, 69Y	74M

Les nouvelles mutations sont présentées en rouge.

Tableau 12-b) Nouvelles mutations du patient 2 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	101R, 179I	71T, 63P	97A
2	101R, 179I	71T, 63P, 69Y	0
3	*	*	0
4	67N , 101R, 179I	16E , 71T, 63P	97A
5	101R, 179I	20R , 71T, 63P	97A , 121Y

Tableau 12-c) Nouvelles mutations du patient 3 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	*	0
2	0	71V, 36I	0
3	0	71V, 36I	138K
4	0	46I, 71V, 36I	0
5	0	*	0

Tableau 12-d) Nouvelles mutations du patient 4 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 181I, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
2	<u>215V, 184V</u> , 67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
3	<u>181I, 221Y, 215V</u> , 67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
4	67N, 69N, 219Q, 103N, 225H, 181I, 179I	71T, 89V, 63P, 36I, 69K	0
5	*	*	*

Tableau 12-e) Nouvelles mutations du patient 5 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	184I, 90I, 179I, 230I	63P, 36I	0
2	<u>230I, 106I, 184I</u> , 90I, 179I	63P, 36I	0
3	90I, 179I	63P, 36I	0
4	184I, 90I, 179I, 230I	63P, 36I	0
5	90I, 179I	63P, 36I	0

Tableau 12-f) Nouvelles mutations du patient 6 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0

Tableau 12-g) Nouvelles mutations du patient 7 :

	RT	PROTEASE	INTEGRASE
1	90I	10I, 60E	0
2	90I	10I, 60E	0
3	90I	10I, 60E	0
4	90I	10I, 60E	0
5	90I	10I, 60E	0

Tableau 12-h) Nouvelles mutations du patient 8 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	0	36I, 69K, 89M	74I
2	*	*	*
3	0	36I, 69K, 89M	74I
4	0	36I, 69K, 89M	74I
5	0	36I, 69K, 89M	74I

Tableau 12-i) Nouvelles mutations du patient 9 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	184V, 138A	90M, 63P, 20M, 36I	74I
2	184V, 138A, 179I	90M, 63P, 36I	74I
3	184V, 138A	90M, 63P, 36I	74I
4	184V, 138A	90M, 63P, 36I	74I
5	184V, 138A	90M, 63P	74I

Tableau 12-j) Nouvelles mutations du patient 10 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	*	*	0
2	98S	10I, 63P	*
3	184I, 98S, 230I	10I, 63P, 36I	0
4	*	*	0
5	98S, 230I	10I, 63P, 46L	0

Tableau 12-k) Nouvelles mutations du patient 11 :

	RT	PROTEASE	INTEGRASE
1	184I	71T, 63P	0
2	0	71T, 63P	0
3	184I	71T, 63P, 36I	138K
4	0	71T, 63P	*
5	0	71T, 63P	0

Tableau 12-I) Nouvelles mutations du patient 12 :

	TI	PROTEASE	INTEGRASE
1	67N, 138A	60E, 71V, 63P	0
2	*	*	0
3	138A	60E, 71V, 63P	0
4	138A	60E, 71V, 63P	0
5	*	*	0

3.1. Comparaison de l'historique de géotypages sur ARN plasmatique au résultat du géotypage sur ADN

Les mutations de résistance présentes sur les géotypages antérieurs réalisés sur ARN plasmatique au cours de l'histoire thérapeutique du patient, ont été comparées au profil de mutations observé avec le géotypage sur ADN (cumul de l'ensemble des échantillons pour chaque patient) aux seuils de 20% et de 10% (voir tableau 13). Les patient 3 et 10 n'avaient aucun géotype antérieur et ne sont donc pas inclus dans ce tableau.

De façon générale, les profils de mutations sur ARN et ADN sont similaires, et cette similitude est compatible avec le fait que les échantillons proviennent du même patient.

La comparaison pour l'ensemble des patients permet de faire les observations suivantes :

- Certaines mutations non présentes sur tous les échantillons ADN d'un même prélèvement (et donc responsables de discordances) ont été retrouvées sur l'historique ARN. Il s'agit de l'insertion 69 (résistance aux INTI), et de la mutation L74M (résistance aux INI) chez le patient 1, et de la mutation Y181I (résistance aux INNTI) pour le patient 4.
- Parmi les mutations qui ne sont pas présentes sur tous les échantillons au seuil de 20%, la majorité (7 mutations sur 10) n'ont pas été identifiées par les géotypages sur ARN.
- Lorsque le seuil de détection est fixé à 10%, la plupart des nouvelles mutations à l'origine de discordance entre les échantillons d'un même prélèvement (22 mutations sur 25), ne sont pas retrouvées également sur l'historique des géotypes ARN.

Tableau 13 : Données cumulées des précédents résultats de génotypage sur ARN plasmatique, résultat génotypage sur ADN aux seuils de 20% et 10%.

	Classe thérapeutique	Historique ARN	Cumul ADN à 20%	Cumul ADN à 10%
Patient 1 2 génotypages ARN	INTI	M41L, insertion 69, T215Y	M41L, <u>insertion 69</u>, T215Y, <u>T69S, M184V</u>	M41L, <u>insertion 69</u>, T215Y, <u>T69S, M184V</u>
	INNTI	0	0	<u>M230I</u>
	IP	L63P, I62V, H69Y	L63P, H69Y	L63P, H69Y, <u>N88S</u>
	INI	L74M	<u>L74M</u> , <u>L74I</u>	<u>L74M</u>, <u>L74I</u>
Patient 2 1 génotypage ARN	INTI	0	0	<u>D67N</u>
	INNTI	V179I	V179I , K101R	V179I , K101R
	IP	L63P, A71T, V77I	L63P, A71T, <u>H69Y</u>	L63P, A71T, <u>H69Y</u>, <u>G16E</u>, <u>K20R</u>
	INI	0	<u>T97A</u>, <u>F121Y</u>	<u>T97A</u>, <u>F121Y</u>
Patient 4 1 génotypage ARN	INTI	D67N, T69N, K219Q	D67N, T69N, K219Q	D67N, T69N, K219Q, <u>T215V</u>, <u>M184V</u>
	INNTI	K103N, H221Y, P225H, Y181I	K103N, P225H, <u>Y181I</u>	K103N, P225H, <u>Y181I</u>, <u>H221Y</u>
	PR	M36I, L63P, H69K, L89V, A71T	M36I, L63P, H69K, L89V, A71T	M36I, L63P, H69K, L89V, A71T
	INI	0	0	0

Patient 5 1 génotypage ARN	INTI	0	<u>M184I</u>	<u>M184I</u>
	INNTI	V90I	V90I, V179I, <u>M230I</u>	V90I, V179I, <u>M230I</u>, <u>V106I</u>
	IP	L10I, M36I, L63P, V77I	M36I, L63P	M36I, L63P
	INI	0	0	0
Patient 6 2 génotypages ARN	INTI	M184V, L210W	0	0
	INNTI	0	0	0
	IP	0	0	0
	INI	0	0	0
Patient 7 1 génotypage ARN	INTI	0	0	0
	INNTI	V90I	V90I	V90I
	IP	L10I, I15V, D60E	L10I, D60E	L10I, D60E
	INI	0	0	0
Patient 8 3 génotypages ARN	INTI	0	0	0
	INNTI	0	0	0
	IP	I15V, K20I, M36I, H69K, L89M	M36I, H69K, L89M	M36I, H69K, L89M
	INI	L74I	L74I	L74I

Patient 9 6 génotypes ARN	INTI	M184V	M184V	M184V
	INNTI	E138A	E138A	E138A, <u>V179I</u>
	IP	L63P, L90M	L63P, L90M	L63P, L90M, <u>K20M</u>, <u>M36I</u>
	INI	L74M, L74I	L74I	L74I
Patient 11 1 génotype ARN	INTI	0	0	<u>M184I</u>
	INNTI	0	0	0
	IP	A71T, I62V, V77I, L63P	A71T, L63P	A71T, L63P, <u>M36I</u>
	INI	0	0	<u>E138K</u>
Patient 12 1 génotype ARN	INTI	0	<u>D67N</u>	<u>D67N</u>
	INNTI	0	E138A	E138A
	IP	D60E, I62V, L63P, A71V	D60E, A71V, L63P	D60E, A71V, L63P
	INI	0	0	0

Les mutations communes à l'historique des génotypes sur ARN sont représentées en gras.

Les mutations soulignées dans les résultats de génotypes sur ADN ne sont pas présentes sur tous les échantillons.

3.2. Analyse phylogénétique moléculaire

L'analyse phylogénétique a été réalisée pour rechercher au-delà des discordances en matière de mutations de résistance, une divergence entre les séquences issues d'un même prélèvement.

Globalement, toutes les séquences correspondant au même prélèvement sont bien regroupées entre elles, au niveau des différentes régions, comme le montrent les figures 16-18.

Lorsqu'on s'intéresse aux patients pour lesquels, il a été observé une discordance majeure au niveau des mutations de résistance, on remarque parfois un impact sur la similarité entre les séquences. Ainsi par exemple dans la région de la RT, les échantillons 2 et 3 du patient 1 qui montrent le plus de résistances sont très proches et se détachent des 3 autres. Une observation similaire a été faite pour les séquences 1 et 4 du patient 4

3.2.1. Au niveau du gène de la protéase

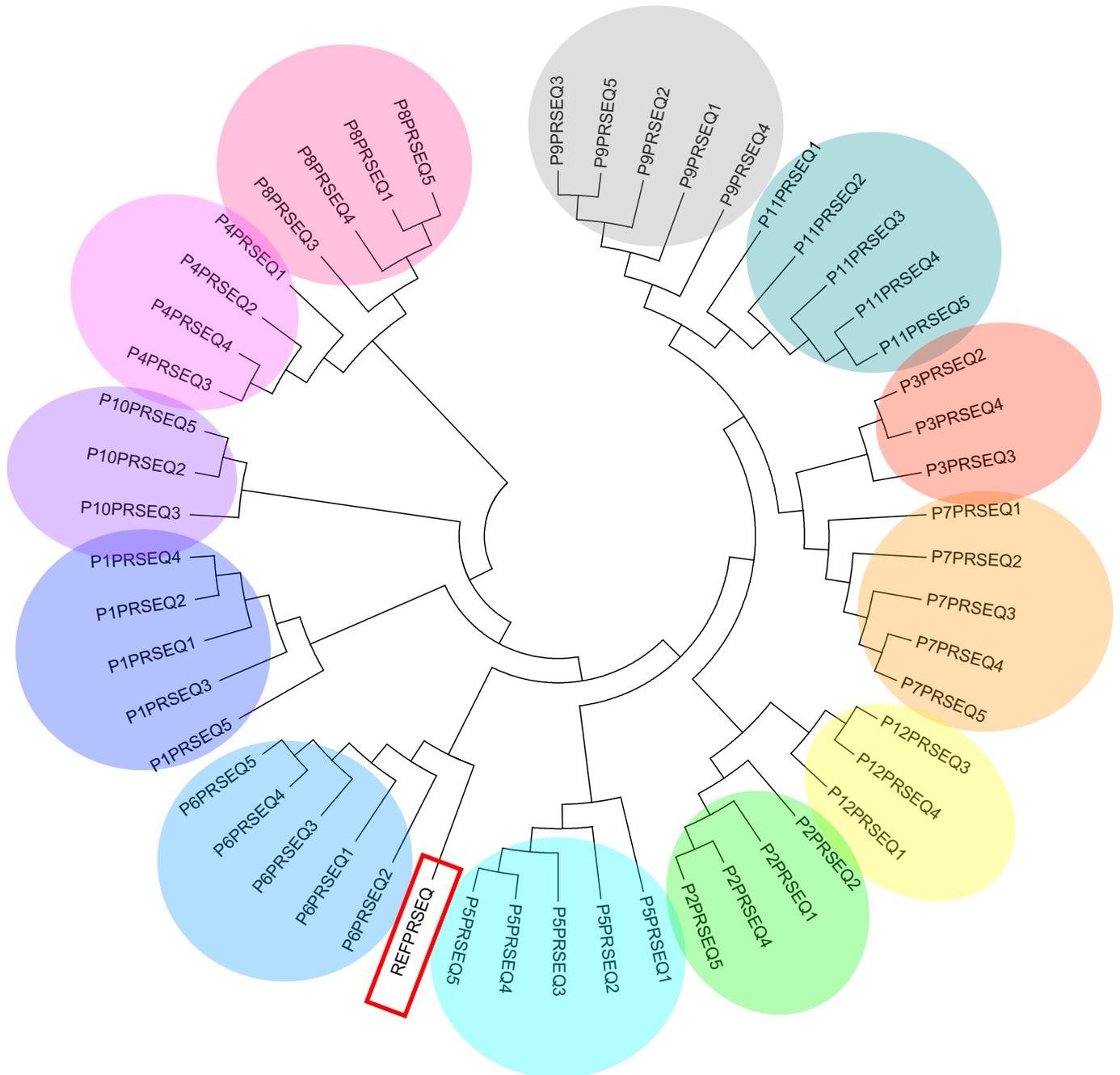


Figure 16 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de la protéase du VIH-1.

REFPRSEQ : Séquence de référence HXB-2 de la région protéase du VIH-1.

P1PRSEQ1 : P1 (Patient 1), PR (Région de la protéase), SEQ1 : (Séquence correspondant à l'échantillon 1). L'arbre phylogénétique pour la région de la protéase a été réalisé sur 51 séquences de patients et la référence HXB-2. L'arbre a permis de mettre en évidence les 12 patients de façon distincte.

3.2.2. Au niveau du gène de la transcriptase inverse

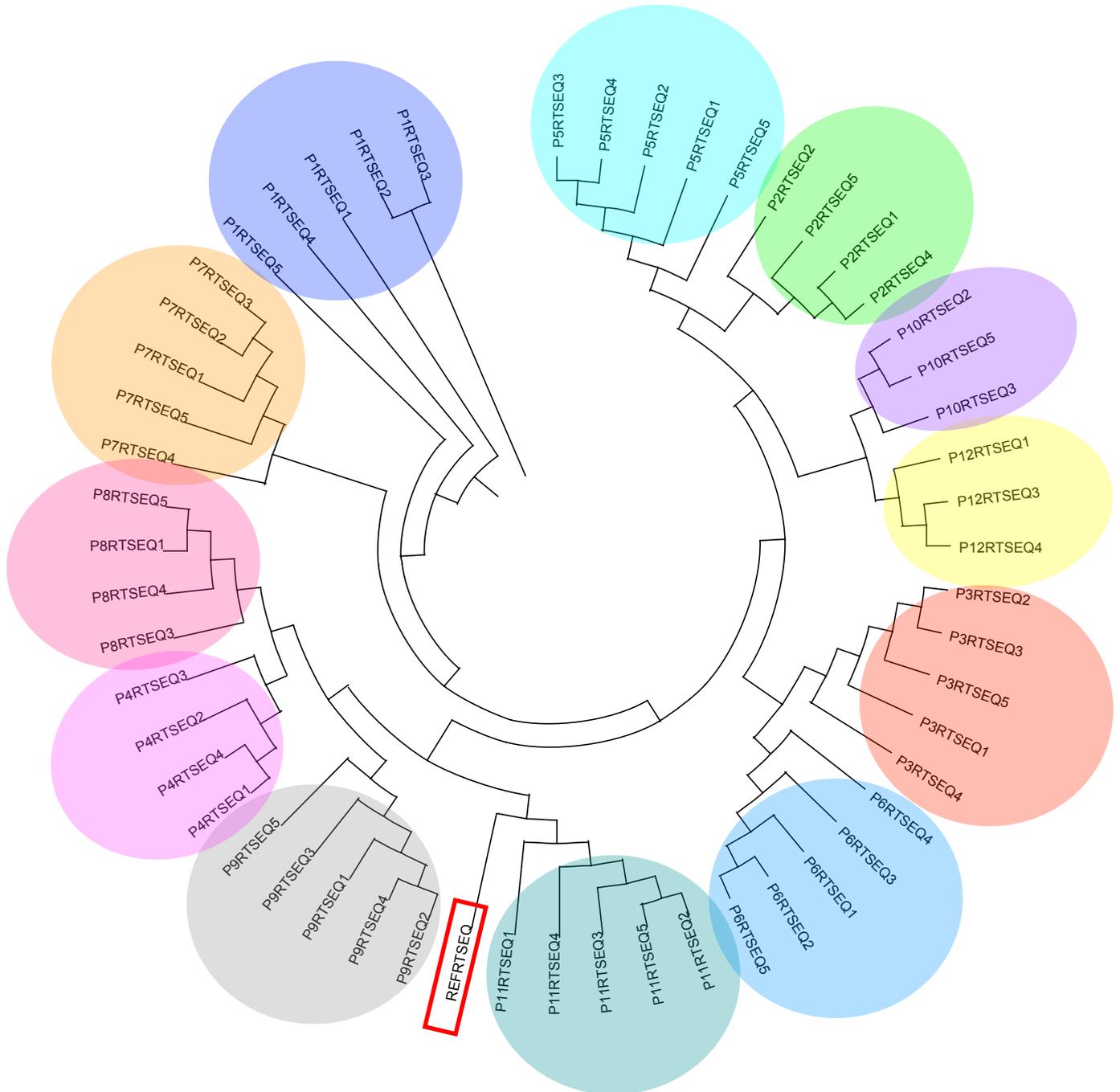


Figure 17 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de la TI du VIH-1.

REFRTSEQ : Séquence de référence HXB-2 de la région de la TI du VIH-1.

P1RTSEQ1 : P1 (Patient 1), RT (Région de la TI), SEQ1 : (Séquence correspondant à l'échantillon 1). L'arbre phylogénétique de la région de la TI est composé de 52 séquences en plus de la séquence de référence HXB-2. Les échantillons correspondant à chacun des 12 patients sont bien indépendants au sein de l'arbre.

3.2.3. Au niveau du gène de l'intégrase



Figure 18 : Arbre phylogénétique moléculaire de la région de l'intégrase du VIH-1.

REFINSEQ : Séquence de référence HXB-2 de la région de l'intégrase du VIH-1.

P1INSEQ1 : P1 (Patient 1), IN (Région de l'intégrase), (SEQ1) : séquence correspondant à l'échantillon 1). L'arbre phylogénétique a été construit à partir de 55 séquences virales provenant de l'ensemble des échantillons séquencés et d'une référence HXB-2. Les échantillons issus d'un même prélèvement sont bien regroupés au niveau de l'arbre.

4. Discussion

Actuellement, les traitements antirétroviraux sont robustes et permettent un contrôle rapide de la réplication virale du VIH. Cependant, dans la majorité des cas, un rebond virologique est observé à l'arrêt du traitement, à cause de l'existence d'un réservoir. L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule infectée est en effet à l'origine de la persistance du virus dans l'organisme. Ainsi, la constitution de ce réservoir permet au VIH d'échapper au système immunitaire et aux molécules antirétrovirales (58). La quantification de l'ADN VIH-1 dans les cellules mononucléées du sang périphérique constitue une estimation de ce réservoir et a été considérée comme ayant un intérêt pronostique dans l'évolution clinique et immuno-virologique de l'infection (73,75–78). Les techniques de PCR en temps réel sont utilisées en routine pour cette quantification. La répartition inconstante du virus dans les cellules rend possible une variabilité de la quantification en fonction de la prise d'essai. Dans ce travail, nous avons évalué cette variabilité en quantifiant cinq échantillons différents issus du même prélèvement, et en utilisant la trousse Generic HIV DNA CELL (Biocentric, Bandol, France) issue des recherches de l'ANRS (91). L'ensemble des échantillons issus d'un même prélèvement ont été analysés dans la même série pour en assurer la comparabilité. Nous avons observé que la variabilité de la charge virale ADN VIH-1 entre les échantillons dépendait des prélèvements avec un coefficient de variation (CV) au sein d'un même prélèvement pouvant aller de 23% pour les plus homogènes, jusqu' à 89% pour les échantillons les moins reproductibles. Cette variabilité ne semblait pas liée à la richesse en ADN VIH-1 du prélèvement car le CV moyen était de 48% pour les prélèvements avec une charge initiale < 500 copies/ 10^6 leucocytes contre 42% pour ceux dont la charge virale est > 500 copies/ 10^6 leucocytes ($p= 0.58$). Ces différences sont probablement liées également à la répartition non homogène des cellules infectées. Néanmoins, l'absence de reproductibilité de l'extraction pour les charges faibles pourrait jouer un rôle dans cette variabilité, car le CV moyen pour la concentration en ADN total (en ng/ μ L) des prélèvements avec une charge virale < 500 copies/ 10^6 leucocytes était de 32% contre 19% pour ceux dont la charge virale est > 500 copies/ 10^6 leucocytes, même si la différence n'est pas statistiquement significative ($p= 0.18$).

Le test génotypique de résistance VIH-1 est habituellement réalisé avant l'initiation du traitement et en cas d'échec, sur l'ARN plasmatique pour ces patients qui ont une charge virale détectable. Les patients en succès virologique représentent

actuellement la majorité des patients traités dans les pays industrialisés. Ainsi, en France par exemple, environ 90% des patients VIH ont une charge virale plasmatique indétectable sous traitement (92). Pour ces patients en succès virologique, une modification de traitement peut être envisagée dans le but de diminuer certains effets indésirables ou d'alléger le traitement en cours, mais elle ne doit en aucun cas affecter l'efficacité du traitement. Avant d'entreprendre un tel changement, il est nécessaire de prendre en compte les antécédents de résistances acquises dans l'histoire thérapeutique afin de diminuer le risque d'échec thérapeutique (93). Lorsque les tests antérieurs de résistance sur l'ARN plasmatique sont inexistantes ou non suffisamment informatifs, un génotypage sur ADN VIH-1 peut être envisagé. C'est aussi le cas pour les patients dont la charge virale plasmatique n'est pas indétectable, mais ne permet pas un séquençage optimal sur l'ARN plasmatique. L'intérêt du génotypage de résistance sur ADN VIH-1 est limité ou inexistant dans les autres situations où un génotypage optimal sur ARN est possible (80,81,94).

Théoriquement, les mutations de résistance apparues au cours de l'histoire thérapeutique peuvent s'archiver dans le réservoir et pourraient être mise en évidence sur un test génotypique sur ADN, mais ce dernier est souvent mis en défaut par rapport à l'historique des mutations (84,85). Cette mauvaise sensibilité est probablement liée à une cinétique variable des mutations dans le réservoir. Néanmoins, cette baisse de sensibilité sur ADN pourrait être expliquée au moins en partie par une distribution non homogène des différents variants du VIH-1 dans les cellules (Loi de Poisson) et par un faible volume de prise d'essai (95,96). Dans le présent travail, nous avons évalué la variabilité des données de génotypage entre cinq échantillons issus du même prélèvement. Dans notre étude, l'ADN total cellulaire a été extrait à partir d'un volume important de sang total afin de diminuer le biais qui pourrait être lié à une faible prise d'essai. Les échantillons issus d'un même prélèvement ont été passés dans la même série de séquençage.

L'analyse des données quantitatives de séquençage (comme le nombre de reads, et la couverture) a montré une variabilité importante d'un prélèvement à un autre.

En prenant en compte l'ensemble des échantillons examinés pour chaque patient, la présence d'au moins une mutation de résistance était relativement fréquente : 8, 11 et 5 patients respectivement pour les régions de la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase ; cependant il s'agissait essentiellement de mutations mineures pour le gène de la protéase.

L'analyse des différents échantillons de chaque prélèvement a montré des discordances en ce qui concerne les mutations de résistance identifiées. Ainsi 5, 3 et 3 patients avaient des discordances entre les échantillons, respectivement dans les régions de la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. Ces discordances entre échantillons ont donné lieu chez certains patients à des différences majeures d'interprétation de la sensibilité (passage de sensible à résistant ou inversement) aux INTI (3 patients), aux INNTI (3 patients) et 2 patients (INI). Aucune différence majeure n'a été observée pour les IP.

De façon intéressante ces discordances majeures sont liées à la présence sur certains échantillons de mutations habituellement associées à des virus hypermutés qui sont considérés comme défectifs. Ainsi pour 2 patients sur 3, la différence d'interprétation pour les INTI est due à la présence de la mutation M184I. De même, en ce qui concerne les INNTI, la mutation M230I a été observée pour 2 patients sur certains échantillons seulement. En ce qui concerne les INI, la présence de la mutation E138K était responsable de la discordance chez l'un des 2 patients.

La raison la plus évidente des discordances entre les séquences ADN VIH-1 issus du même prélèvement est la répartition non homogène des différents variants du VIH-1 dans les cellules selon la loi de poisson, comme évoquée plus haut. En effet, du fait de la quasi-espèce virale, les cellules peuvent héberger plusieurs variants, avec une divergence possible d'une cellule à l'autre. La diversité du réservoir est bien connue avec une hétérogénéité des séquences provirales bien documentée par les études (97).

Nous avons observé que la plupart des discordances majeures était associée à l'existence des séquences hypermutées qui sont habituellement retrouvées dans l'ADN proviral et qui correspondent à des virus défectifs.

Ces séquences hypermutées (comportant des codons stop ou des mutations G à A) résultent de l'activité de l'APOBEC3G représentent environ 15% des séquences archivées dans les cellules (98).

Ces séquences hypermutées sont à l'origine d'une interférence (diminution de la spécificité) lors de l'interprétation des résultats de génotypage de résistance sur ADN, en comparaison au test sur ARN. Ainsi les mutations qui y sont associées ne sont souvent observées que sur l'ADN et pas sur l'ARN plasmatique, même en utilisant les techniques de séquençage haut débit (82,99). Dans ce travail, ces mutations observées sur l'ADN n'étaient pas présentes sur l'historique des

génotypes sur ARN pour les patients qui disposaient au moins d'un test génotypique antérieur.

En routine clinique, ce phénomène a été observé dans plus de 6% des séquences issues du génotypage de résistance sur ADN VIH-1 en utilisant la technique Sanger, et ces séquences présentent habituellement un nombre plus élevé de mutations de résistance (88).

Une analyse bioinformatique a permis d'identifier 17 mutations de résistance habituellement associées à l'hypermutation : 30N, 46I, 48S, 73S sur le gène de la protéase ; 67N, 138K, 184I, 190E, 190S, 230I pour la transcriptase inverse, et en ce qui concerne le gène de l'intégrase, les mutations 118R, 138K, 140S, 163K, 163R, 232N et 263K (<https://hivdb.stanford.edu/page/apobec3>).

Il n'y a actuellement pas de recommandations formelles quant à la conduite à tenir par rapport à ces mutations lorsqu'elles sont retrouvées sur un génotypage de résistance sur ADN (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Ceci mène parfois à une démarche prudente consistant à les rendre avec comme conséquences une surestimation des résistances et donc une diminution du nombre de molécules actives possibles.

Néanmoins, toutes les mutations à l'origine de discordance n'étaient pas toutes des mutations associées aux virus défectifs. De plus, certaines de ces mutations ont été retrouvées sur l'historique de génotypes ARN, permettant ainsi d'améliorer la concordance entre génotypes ARN et ADN. Ainsi donc la répétition des passages pour le génotypage sur ADN peut permettre parfois de rattraper des mutations de résistance ayant un impact potentiel sur le traitement à mettre en œuvre.

Dans ce travail, nous avons utilisé une technique de NGS, car nous avons émis comme hypothèse que le défaut de concordance entre les échantillons d'un même prélèvement pourrait aussi être lié à une limite de sensibilité de la technique. La technique de Sanger qui est la plus répandue permet de détecter les mutations présentes à une prévalence de 20% et plus. Les techniques de NGS permettent de mettre en évidence des variants en dessous de ce seuil, même si l'impact clinique de ces variants dits minoritaires n'a été démontré que pour les INNTI de première génération (100). L'automatisation de cette technique et son optimisation permettent de plus en plus une utilisation en routine y compris pour le génotypage sur ADN (88,101,102).

L'analyse des mutations de résistances a été refaite au seuil de 10% pour voir l'impact sur la concordance entre les échantillons. Comme attendu, il y avait plus de mutations de résistance au seuil de 10%. Néanmoins, si cette analyse a fait rarement apparaître des mutations qui ont amélioré la concordance entre les échantillons, il s'agit pour la majorité de nouvelles mutations qui ont accentué l'absence de reproductibilité des résultats entre les échantillons d'un même prélèvement.

Malgré les discordances observées en termes de mutations de résistance et qui sont le reflet de la diversité du réservoir, les séquences issues d'un même prélèvement restent néanmoins très proches comme le montre l'analyse phylogénétique présentée dans ce travail.

5. Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué la variabilité des résultats de génotypage de résistance sur ADN du VIH-1 dans un même prélèvement, chez des patients VIH-1 sous traitement antirétroviral.

Nous avons montré qu'il peut exister une variabilité dans la quantification de l'ADN proviral, et dans les données de séquençage sur l'ADN entre plusieurs échantillons issus d'un même prélèvement. Cette variabilité peut entraîner des différences majeures d'interprétation d'un échantillon à un autre, mais ne semble pas impacter la similitude globale entre les séquences issues d'un même prélèvement. Les séquences hypermutées semblent contribuer de façon importante à ces discordances. L'intérêt clinique d'une répétition du génotypage de résistance sur l'ADN reste à évaluer. Il peut par exemple être utile pour un patient candidat au changement thérapeutique n'ayant aucun génotype antérieur disponible, augmenter la chance de retrouver une potentielle mutation d'intérêt, ou à l'inverse conforter le résultat initial. Dans tous les cas, il restera à trancher la question des mutations décrites comme associées aux virus défectifs.

ANNEXES

Annexe 1 : Algorithmes d'interprétation des mutations de résistance aux antirétroviraux ANRS 2019 (v30).

November 2019 - Version n°30

ANRS - AC 43: RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

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

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir, TAF: tenofovir alafenamide

For didanosine and stavudine refer to previous rules (See Archives, September 2017, version 27)

For DNA provirus, impact of stop codons and G to A mutations on ARV resistance is unknown

**ANRS - AC 43: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS**

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
EFV	<ul style="list-style-type: none"> • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106M [2] • E138K [12, 13] • Y181C/I • Y188C/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • P225H • M230L 	
NVP	<ul style="list-style-type: none"> • A98S (for HIV-1 subtype C only) [3] • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106A/M [2] • Y181C/I • Y188C/H/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • M230L 	<ul style="list-style-type: none"> • E138K [13]
ETR	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138K [12, 13] • Y181C/I/V [5, 6] • H221Y [12,16] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138A/G/Q/R/S [5, 6, 7, 8]
RPV	<ul style="list-style-type: none"> • K101E/P [9, 13] • E138A/G/K/Q/R/S [12, 13, 14] • V179L [9] • Y181C/I/V [13] • Y188L [9] • F227C [9] • H221Y [13] • M230I/L/V [9] • L100I + K103N/S [9, 15] • L100I + K103R + V179D [15] 	<ul style="list-style-type: none"> • A98G [22]

November 2019 - Version n°30

DOR	<ul style="list-style-type: none"> • V106A/M [17, 18, 19, 20 ,21] • Y188L • G190E/S [21] • M230L • L100I + K103N [17, 19] • K103N + Y181C • K103N + P225H • F227C [21] • At least 4 among: A98G, L100I, K101E, V106I, E138K, Y181C/V, G190A or H221Y [23] 	<ul style="list-style-type: none"> • At least 2 among: A98G, L100I, K101E, V106I, E138K, Y181C/V, G190A or H221Y [23]
-----	--	--

EFV: efavirenz, NVP: nevirapine, ETR: etravirine, RPV : rilpivirine, DOR : doravirine.

For DNA provirus, Impact of stop codons and G to A mutations on ARV resistance is unknown

**ANRS - AC 43: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: PROTEASE INHIBITORS**

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
LPV/r	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71V/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [1, 2, 3, 13] I47A [8, 9] L76V [11, 12] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71V/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [1, 2, 3, 13]
ATV/RTV 300/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> I50L [4] N88S [20,21,22] At least 3 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [5, 7, 14, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [5, 7, 14, 23]
TPV/RTV 500/200 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least a score of + 3*: M36I/L/V – F53L/W/Y + Q58E + H69I/K/N/Q/R/Y + L89I/M/R/T/V [6, 15] 	<ul style="list-style-type: none"> A score of + 2*: M36I/L/V – F53L/W/Y + Q58E + H69I/K/N/Q/R/Y + L89I/M/R/T/V [6, 15]
DRV/RTV** 600/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [10, 16, 17, 18, 19] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [10, 16, 17, 18, 19]
800/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [10, 16, 17, 18, 19] 	

LPV: lopinavir, ATV: atazanavir, TPV: tipranavir, DRV: darunavir, RTV: ritonavir

For indinavir, saquinavir, nelfinavir and fosamprenavir refer to previous rules (See Archives, September 2017, version 27)

* Insufficient data for HIV-1 subtype non-B

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

For DNA provirus, Impact of stop codons and G to A mutations on ARV resistance is unknown

ANRS - AC 43: RESISTANCE GROUP

GENOTYPE INTERPRETATION: INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
RAL	<ul style="list-style-type: none"> • T66A/K [10, 42] • E92Q [1, 2] • G118R [10, 17] • F121Y [10,17] • G140A/S [7] • Y143A/C/G/H/R/S [1, 3, 4, 5, 8, 14] • Q148E/G/H/K/R [1, 2] • V151L [9] • N155H/S/T [1, 2, 9] • E157Q [2] • S230R [18, 33, 34, 35] • R263K [16, 18] • L74 F/I + V75I [38] 	
EVG	<ul style="list-style-type: none"> • T66A/I/K [6] • E92Q [6] • T97A [21,22] • G118R [17] • F121Y [9,17] • E138K • G140A/C/S [36, 43] • Y143A/C/G/H/R/S [14] • P145S [9] • S147G [21] • Q148E/G/H/K/R [6] • V151L [9] • N155H/S/T [6, 9] • E157Q [11, 37] • S230R [18, 33, 34, 35] • R263K [18] • L74F/I + V75I [38] 	

November 2019 - Version n°30

<p>DTG* 50 mg BID</p>	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12,13] • F121Y [17] • V151L [9,25] • S153F/Y [9, 25, 28, 36] • R263K [16] • T66K + L74M [9] • E92Q + N155H [9, 23, 24] • Q148H/K/R + at least 2 mutations among: L74I or T97A or E138A/K/T or G140A/C/S [15, 40, 41] • Q148H/K/R + N155H [9, 29, 30] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • Q148H/K/R + 1 mutation among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15]
<p>50 mg QD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12, 13] • F121Y [17] • E138A/K/T • G140A/C/S • Q148H/K/R • V151L [9, 25] • S153F/Y [9, 25, 28, 36] • N155H [18] • S230R [31] • R263K [16] • T66K + L74M [9] • L74I + E92Q [32] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • E157Q [19, 20, 37]
<p>CAB**</p>	<ul style="list-style-type: none"> • G118R [12, 13] • F121Y [17] • E138A/K/T • G140A/C/R/S [39] • Q148H/K/R • V151L [9, 25] • S153F/Y [9, 25, 28, 36] • N155H [18] • S230R [31] • R263K [16] • T66K + L74M [9] • L74I + E92Q [32] 	<ul style="list-style-type: none"> • T66K [9] • E157Q [19, 20, 37]

November 2019 - Version n°30

<ul style="list-style-type: none">• BIC**	<ul style="list-style-type: none">• G118R [12, 13]• F121Y [17]• E138A/K/T• G140A/C/S• Q148H/K/R• V151L [9, 25]• S153F/Y [9, 25, 28, 36]• N155H [18]• S230R [31]• R263K [16]• T66K + L74M [9]• L74I + E92Q [32]	<ul style="list-style-type: none">• T66K [9]• E157Q [19, 20, 37]
---	---	---

RAL: raltegravir, EVG: elvitegravir, DTG: dolutegravir, CAB: cabotegravir, BIC: bictegravir

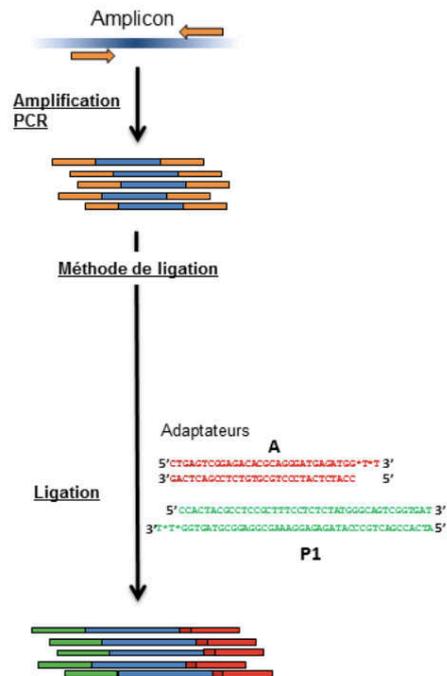
* Please note that rules are different for DTG 50 mg BID and 50 mg QD

**Due to few data and to the very close structures of dolutegravir, cabotegravir and bictegravir some rules for dolutegravir QD are transposed to cabotegravir and bictegravir

For DNA provirus, Impact of stop codons and G to A mutations on ARV resistance is unknown

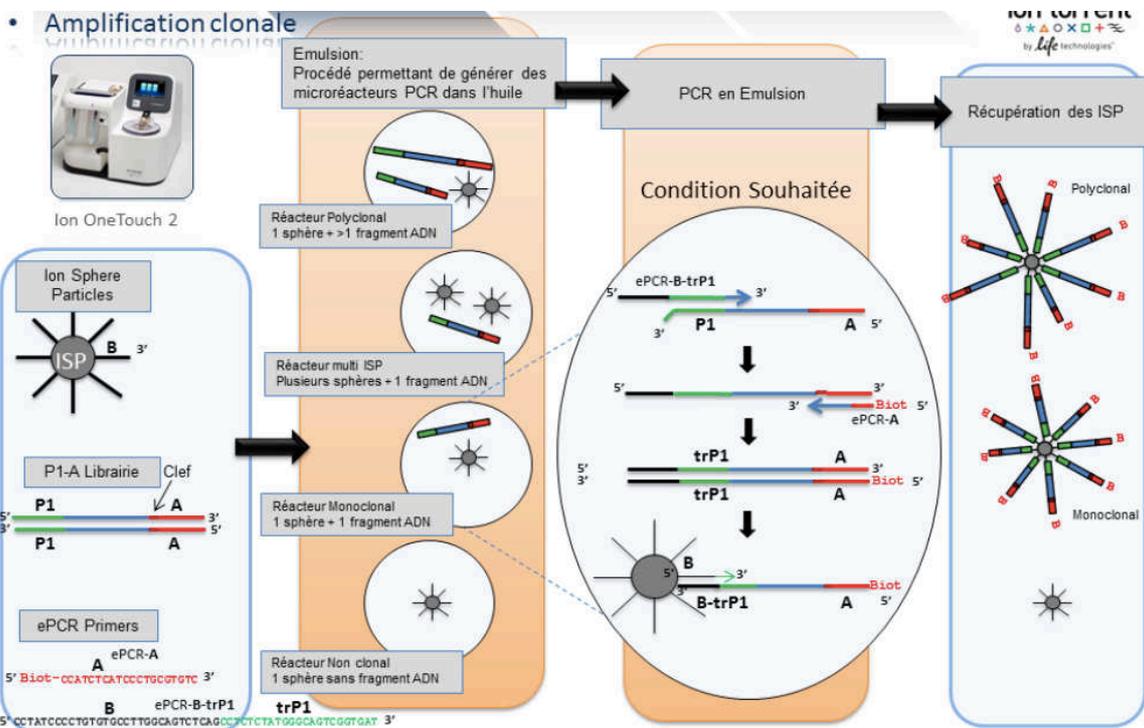
Annexe 2 : Différentes étapes du séquençage après l'extraction et la PCR.

1. Préparation de la librairie



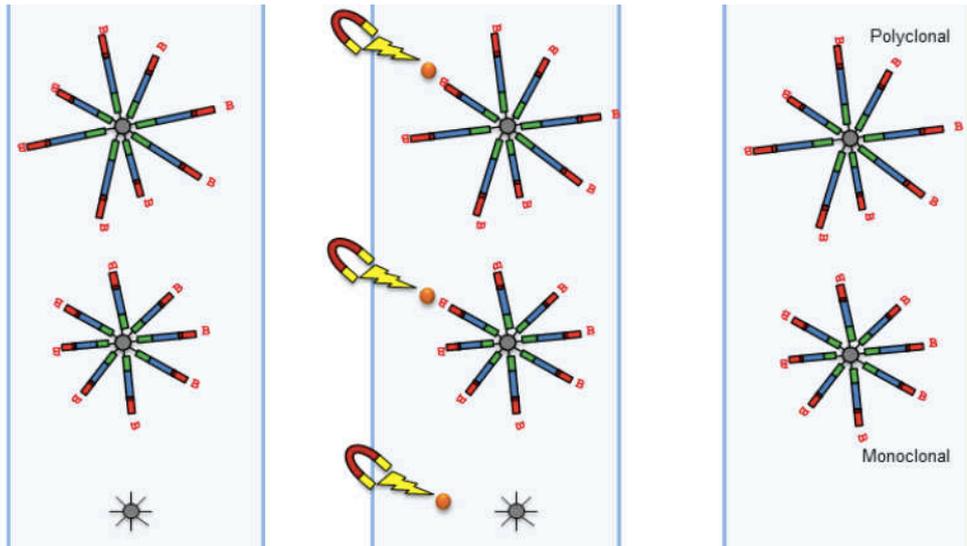
Lors de cette étape les amplicons sont fragmentés, puis des adaptateurs avec un code-barres sont fixés à leurs extrémités par ligation.

2. Amplification clonale



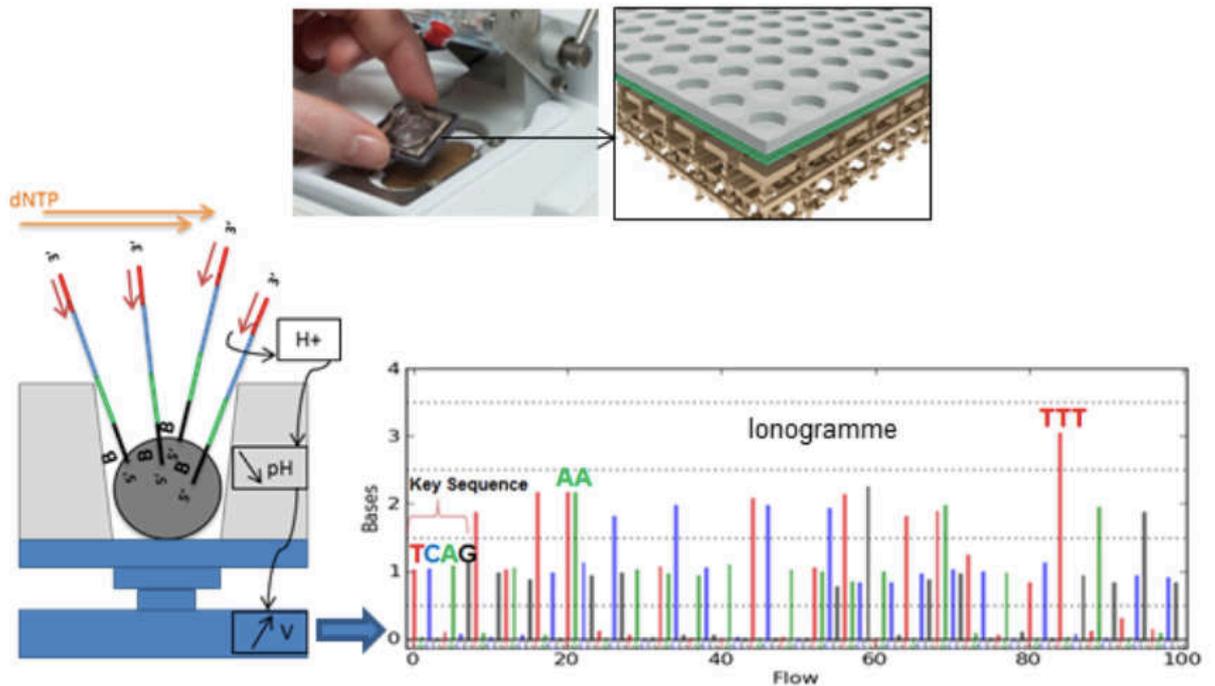
L'amplification clonale est réalisée lors d'une PCR en émulsion, chaque fragment d'ADN fixé à la surface d'une bille ISP est amplifié.

3. Étape d'enrichissement



L'enrichissement des ISP avec les fragments d'ADN est effectuée grâce à l'utilisation de billes magnétiques.

4. Séquençage sur PGM Ion Torrent



La réaction de séquençage consiste en l'analyse simultanée des fragments d'ADN associés aux ISP. Lors de l'incorporation d'un nucléotide, la libération d'un H⁺ entraîne une modification du pH qui est détectée au niveau de la puce semi-conductrice. Les données brutes sont ensuite traduites sous forme de ionogramme.

BIBLIOGRAPHIE

1. ONUSIDA (Organisation des Nations Unies, SIDA). Fiche d'information 2020 - Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de sida. [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>
2. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 20 mai 1983;220(4599):868-71.
3. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. *N Engl J Med*. 10 déc 1981;305(24):1425-31.
4. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M, Santos-Ferreira M, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 18 juill 1986;233(4761):343-6.
5. Le Hingrat Q, Charpentier C, Visseaux B, Damond F, Descamps D. Virus de l'immunodéficience humaine. *EMC - Biol Médicale*. juill 2019;14(3).
6. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007: *AIDS*. mars 2011;25(5):679-89.
7. Peeters M, Chaix M. Origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine : d'où vient-il, où va-t-il ? *Virologie*. 2013;17(3):119-31.
8. Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. Diversité génétique des VIH et ses conséquences. *Pathol Biol*. mars 2009;57(2):142-8.
9. Avettand-Fenoel V. *Traité de virologie médicale : Chapitre 32 : HIV : structure, multiplication et physiopathologie*. 2019. 453-462 p.
10. Pancera M. Structure, function and antigenicity of the HIV1 envelope glycoproteins. *Virologie*. 2005;9(6):457-72.
11. Lekkerkerker A, Kooyk Y, Geijtenbeek T. Viral Piracy: HIV-1 Targets Dendritic Cells for Transmission. *Curr HIV Res*. 1 avr 2006;4(2):169-76.
12. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. janv 2008;214(2):231-41.
13. Hedskog C, Mild M, Albert J. Transmission of the X4 Phenotype of HIV-1: Is There Evidence Against the « Random Transmission » Hypothesis? *J Infect Dis*. 15 janv 2012;205(2):163-5.
14. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis*

Primer. déc 2015;1(1):15035.

15. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell Binding and Entry. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 août 2012;2(8):a006866-a006866.

16. Louis D. S, Cervia JS, Smith MA. Enfuvirtide (T-20): A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitor. Clin Infect Dis. 15 oct 2003;37(8):1102-6.

17. Mammano F, Clavel F. Interactions VIH-cellules : partenaires et adversaires. Virologie. 2013;17(3):145-56.

18. UNAIDS. UNAIDS data 2018 [Internet]. 2018 [cité 24 août 2020]. Disponible sur: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaid-data-2018_en.pdf

19. (European Centre for Disease prevention and Control). HIV/AIDS surveillance in Europe 2018 - 2017 data [Internet]. 2018 [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hiv-aids-surveillance-europe-2018.pdf>

20. Roncier C. Le VIH/sida en France en 2018 [Internet]. 2018 [cité 24 août 2020]. Disponible sur: <https://vih.org/dossier/le-vih-sida-en-france-en-2018/>

21. Santé publique France. VIH/sida : données 2018 sur les découvertes de séropositivité VIH et diagnostics du sida [Internet]. 2019 [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2019/vih-sida-donnees-2018-sur-les-decouvertes-de-seropositivite-vih-et-diagnostics-du-sida>

22. Santé publique France. Bulletin de santé publique VIH/sida. [Internet]. 2019 [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: (Bulletin de santé publique, 9 octobre 2019, santé publique France) <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-sexuellement-transmissibles/vih-sida/documents/bulletin-national/bulletin-de-sante-publique-vih-sida.-octobre-2019>

23. Crips Ile-de-France, Vih.org. Le VIH en 2019 : les clefs pour comprendre. [Internet]. 2018 [cité 24 août 2020]. Disponible sur: <https://www.lecrips-idf.net/ressources/documents/2/8932,Brochure-VIH2019.pdf>

24. Schacker T. Clinical and Epidemiologic Features of Primary HIV Infection. Ann Intern Med. 15 août 1996;125(4):257.

25. Girard P-M, Katlama C, Pialoux G. VIH - Chapitre Primo-infection. DOIN; 2011.

26. Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. The Lancet. avr 2000;355(9210):1131-7.

27. HAS (Haute Autorité de santé). Dépistage de l'infection par le VIH en France - Modalités de réalisation des tests de dépistage [Internet]. 2008 [cité 22 juill 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_704257/fr/depistage-de-l-infection-par-le-vih-en-france-modalites-de-realisation-des-tests-de-depistage
28. HAS (Haute Autorité de santé). Réévaluation de la stratégie de dépistage de l'infection à VIH en France [Internet]. 2017 [cité 22 juill 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2024411/fr/reevaluation-de-la-strategie-de-depistage-de-l-infection-a-vih-en-france
29. Roncier C. VIH: L'insuffisant recours au dépistage [Internet]. 2018 [cité 22 juill 2020]. Disponible sur: <https://vih.org/20181130/vih-linsuffisant-recours-au-depistage/>
30. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. sept 2003;17(13):1871-9.
31. Barin F, Simon F. Les outils du dépistage de l'infection par le VIH : concepts, progrès et limites. *Virologie*. 2013;17(3):171-81.
32. Légifrance. Arrêté du 28 mai 2010 fixant les conditions de réalisation du diagnostic biologique de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2) et les conditions de réalisation du test rapide d'orientation diagnostique dans les situations d'urgence [Internet]. [cité 26 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022320859&categorieLien=id>
33. Tuailon E, Bourlet T. *Traité de virologie médicale : Chapitre 33 : HIV : diagnostic et suivi biologique*. 2019. 463-472 p.
34. Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH, sous la direction du Pr Philippe Morlat. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : Infection VIH-2 ; Diversité des VIH-1*. [Internet]. 2016 [cité 25 août 2020]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_diversite.pdf
35. Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH, sous la direction du Pr Philippe Morlat. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : Initiation d'un premier traitement antirétroviral, actualisation avril 2018* [Internet]. 2018 [cité 9 juill 2020]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_initiation.pdf
36. WHO. *Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV september 2015* [Internet]. [cité 9 juill 2020]. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186275/9789241509565_eng.pdf?se

quence=1

37. Charpentier C, Delaugerre C, Morand-Joubert L. Traité de virologie médicale : Chapitre 34 : HIV : traitement et prévention. 2019. 473-488 p.
38. Singh K, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Sarafianos SG. Structural Aspects of Drug Resistance and Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Viruses*. 11 févr 2010;2(2):606-38.
39. Craigie R. The molecular biology of HIV integrase. *Future Virol*. juill 2012;7(7):679-86.
40. Ali A, Bandaranayake RM, Cai Y, King NM, Kolli M, Mittal S, et al. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease. *Viruses*. 12 nov 2010;2(11):2509-35.
41. MacArthur RD, Novak RM. Reviews Of Anti-infective Agents: Maraviroc: The First of a New Class of Antiretroviral Agents. *Clin Infect Dis*. 15 juill 2008;47(2):236-41.
42. Palich R, Katlama C, Ghosn J. Prise en charge de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *EMC - Mal Infect*. août 2018;15(3).
43. European AIDS Clinical Society (EACS). EACS Guidelines 2019 [Internet]. 2019 [cité 3 oct 2020]. Disponible sur: https://www.eacsociety.org/files/2019_guidelines-10.0_final.pdf
44. Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH, sous la direction du Pr Philippe Morlat. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : Suivi de l'adulte vivant avec le VIH et organisation des soins [Internet]. 2018 [cité 25 août 2020]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2018/05/experts-vih_suivi.pdf
45. Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH, sous la direction du Pr Philippe Morlat. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : Résistance du VIH-1 aux antirétroviraux [Internet]. 2016 [cité 27 août 2020]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/02/experts-vih_resistance.pdf
46. Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Brun-Vézinet F, 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*. 15 juill 2008;47(2):266-85.
47. Delaugerre C. Barrière génétique à la résistance des antirétroviraux. *Médecine Mal Infect*. sept 2010;40:S1-10.
48. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol*. déc 2016;46:292-307.

49. Brun-Vézinet F, Charpentier C, Descamps D. Chapitre 33, Résistance aux antirétroviraux. In: VIH. DOIN. 2001. p. 461-85.
50. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1 déc 1977;74(12):5463-7.
51. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* juin 1986;321(6071):674-9.
52. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* oct 2008;26(10):1135-45.
53. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* sept 2008;9(1):387-402.
54. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* juill 2011;475(7356):348-52.
55. Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012;13(1):341.
56. Lacoste Deixonne C. Apport du séquençage haut débit dans l'amélioration de la prise en charge des maladies monogénétiques. D'Aix-Marseille; 2016.
57. Frentz D, Boucher CAB, Assel M, De Luca A, Fabbiani M, Incardona F, et al. Comparison of HIV-1 Genotypic Resistance Test Interpretation Systems in Predicting Virological Outcomes Over Time. *Ng LFP, éditeur. PLoS ONE.* 9 juill 2010;5(7):e11505.
58. Rouzioux C, Avettand-Fenoel V, Autran B. Réservoirs et réponses immunitaires au cours de l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1. *Virologie.* 2013;17(3):157-68.
59. Trémeaux P, Rouzioux C, Avettand-Fènoël V. Réservoirs cellulaires et tissulaires du VIH-1 : dynamique au cours de l'infection. *Virologie.* 2019;23(4):211-28.
60. Aid M, Dupuy FP, Moysi E, Moir S, Haddad EK, Estes JD, et al. Follicular CD4 T Helper Cells As a Major HIV Reservoir Compartment: A Molecular Perspective. *Front Immunol.* 18 juin 2018;9:895.
61. Nolan DJ, Rose R, Rodriguez PH, Salemi M, Singer EJ, Lamers SL, et al. The Spleen Is an HIV-1 Sanctuary During Combined Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* janv 2018;34(1):123-5.
62. Sebastian NT, Collins KL. Targeting HIV latency: resting memory T cells, hematopoietic progenitor cells and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther.* oct

2014;12(10):1187-201.

63. 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.* févr 2015;63(1):53-9.
64. Wang Z, Simonetti FR, Siliciano RF, Laird GM. Measuring replication competent HIV-1: advances and challenges in defining the latent reservoir. *Retrovirology.* déc 2018;15(1):21.
65. Bruel T, Schwartz O. Markers of the HIV-1 reservoir: facts and controversies. *Curr Opin HIV AIDS.* sept 2018;13(5):383-8.
66. Kiselinova M, De Spiegelaere W, Buzon MJ, Malatinkova E, Lichterfeld M, Vandekerckhove L. Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth. *Swanstrom R, éditeur. PLOS Pathog.* 3 mars 2016;12(3):e1005472.
67. Munir S, Thierry S, Subra F, Deprez E, Delelis O. Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology.* 2013;10(1):87.
68. Pasternak AO, Lukashov VV, Berkhout B. Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology.* déc 2013;10(1):41.
69. Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, Sengupta S, et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature.* févr 2019;566(7742):120-5.
70. 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.* 1 mars 2006;42(5):709-15.
71. Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, Cheret A, Frange P, Melard A, et al. Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.* oct 2016;29(4):859-80.
72. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1--Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin Infect Dis.* 1 oct 2005;41(7):1053-6.
73. 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.* mai 2013;68(5):1169-78.
74. Cheret A, Bacchus-Souffan C, Avettand-Fenoel V. Combined ART started during acute HIV infection protects central memory CD4+ T cells and can induce

remission. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 21 avr 2015 [cité 9 sept 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/article/70/7/2108/778253/Combined-ART-started-during-acute-HIV-infection>

75. Hocqueloux L, Viard J. Implications cliniques et thérapeutiques de la quantification des réservoirs du VIH. *Virologie*. 2019;23(4):241-9.

76. Ghosn J, Deveau C, Chaix M-L, Goujard C, Galimand J, Zitoun Y, et al. Despite being highly diverse, immunovirological status strongly correlates with clinical symptoms during primary HIV-1 infection: a cross-sectional study based on 674 patients enrolled in the ANRS CO 06 PRIMO cohort. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2010;65(4):741-8.

77. Williams JP, Hurst J, Stöhr W, Robinson N, Brown H, Fisher M, et al. HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *eLife*. 12 sept 2014;3:e03821.

78. Hatzakis AE, Touloumi G, Pantazis N, Anastassopoulou CG, Katsarou O, Karafoulidou A, et al. Cellular HIV-1 DNA load predicts HIV-RNA rebound and the outcome of highly active antiretroviral therapy: AIDS. nov 2004;18(17):2261-7.

79. Lambotte O, Chaix M-L, Gubler B, Nasreddine N, Wallon C, Goujard C, et al. The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution: AIDS. mai 2004;18(8):1147-58.

80. 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*. 15 juin 2007;44(12):1657-61.

81. 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*. 1 juin 2007;45(6):1783-8.

82. Alidjinou EK, Deldalle J, Hallaert C, Robineau O, Ajana F, Choisy P, et al. RNA and DNA Sanger sequencing versus next-generation sequencing for HIV-1 drug resistance testing in treatment-naive patients. *J Antimicrob Chemother*. 1 oct 2017;72(10):2823-30.

83. Venturi G, Romano L, Carli T, Corsi P, Pippi L, Valensin P. Divergent distribution of HIV-1 drug-resistant variants on and off antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. 2002;7(4):245-50.

84. 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*. 1

avr 2011;66(4):709-12.

- 85.** Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere M, 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: Drug resistance in HIV-1 DNA and RNA. *HIV Med.* avr 2012;n/a-n/a.
- 86.** Zaccarelli M, Santoro MM, Armenia D, Borghi V, Gennari W, Gori C, et al. Genotypic resistance test in proviral DNA can identify resistance mutations never detected in historical genotypic test in patients with low level or undetectable HIV-RNA. *J Clin Virol.* sept 2016;82:94-100.
- 87.** 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.* août 2016;71(8):2248-51.
- 88.** Alidjinou EK, Coulon P, Hallaert C, Robineau O, Meybeck A, Huleux T, et al. Routine drug resistance testing in HIV-1 proviral DNA, using an automated next-generation sequencing assay. *J Clin Virol.* déc 2019;121:104207.
- 89.** Meybeck A, Alidjinou EK, Huleux T, Boucher A, Tetart M, Choisy P, et al. Virological Outcome After Choice of Antiretroviral Regimen Guided by Proviral HIV-1 DNA Genotyping in a Real-Life Cohort of HIV-Infected Patients. *AIDS Patient Care STDs.* 1 févr 2020;34(2):51-8.
- 90.** Alidjinou EK, Deldalle J, Robineau O, Hallaert C, Meybeck A, Huleux T, et al. Routine drug resistance testing in proviral HIV-1 DNA: Prevalence of stop codons and hypermutation, and associated factors. *J Med Virol.* sept 2019;91(9):1684-7.
- 91.** Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol.* févr 2009;81(2):217-23.
- 92.** Rodriguez C, Nere ML, Demontant V, Charreau I, Mercier-Darty M, Delagreverie H, et al. Ultra-deep sequencing improves the detection of drug resistance in cellular DNA from HIV-infected patients on ART with suppressed viraemia. *J Antimicrob Chemother.* 1 nov 2018;73(11):3122-8.
- 93.** Allavena C, Rodallec A, Leplat A, Hall N, Luco C, Le Guen L, et al. Interest of proviral HIV-1 DNA genotypic resistance testing in virologically suppressed patients candidate for maintenance therapy. *J Virol Methods.* janv 2018;251:106-10.
- 94.** 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.* avr 2007;38(4):313-20.

95. Jung A, Maier R, Vartanian J-P, Bocharov G, Jung V, Fischer U, et al. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature.* juill 2002;418(6894):144-144.

96. Delassus S, Cheynier R, Wain-Hobson S. Nonhomogeneous distribution of human immunodeficiency virus type 1 proviruses in the spleen. *J Virol.* sept 1992;66(9):5642-5.

97. Brooks K, Jones BR, Dilernia DA, Wilkins DJ, Claiborne DT, McNally S, et al. HIV-1 variants are archived throughout infection and persist in the reservoir. Douek DC, éditeur. *PLOS Pathog.* 3 juin 2020;16(6):e1008378.

98. Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* sept 2016;22(9):1043-9.

99. 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. Caliendo AM, éditeur. *J Clin Microbiol.* juin 2016;54(6):1605-15.

100. Li JZ, Kuritzkes DR. Clinical Implications of HIV-1 Minority Variants. *Clin Infect Dis.* 1 juin 2013;56(11):1667-74.

101. Raymond S, Nicot F, Abravanel F, Minier L, Carcenac R, Lefebvre C, et al. Performance evaluation of the Vela Dx Sentosa next-generation sequencing system for HIV-1 DNA genotypic resistance. *J Clin Virol.* janv 2020;122:104229.

102. Weber J, Volkova I, Sahoo MK, Tzou PL, Shafer RW, Pinsky BA. Prospective Evaluation of the Vela Diagnostics Next-Generation Sequencing Platform for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *J Mol Diagn.* nov 2019;21(6):961-70.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2019/2020

Nom : MILLIERE Prénom : Laurine

Titre du mémoire : GENOTYPAGE DE RESISTANCE DU VIH-1 DANS L'ADN PROVIRAL : VARIABILITE DANS UN MEME PRELEVEMENT.

Mots-clés : VIH-1 – ADN proviral – Quantification – Génotypage de résistance – Mutations – Variabilité – Séquençage haut débit.

Introduction : Le test génotypique de résistance sur l'ADN proviral du VIH-1 peut être utile lors d'un changement ou d'une simplification de traitement chez des patients virologiquement contrôlés. Nous avons analysé la variabilité des données de génotypage de résistance sur l'ADN VIH-1 en comparant plusieurs échantillons issus d'un même prélèvement.

Méthode : La quantification de l'ADN du VIH-1 a été réalisée avec trousse Generic HIV DNA CELL (Biocentric). Le séquençage de nouvelle génération (NGS) sur l'ADN proviral du VIH-1 a été effectué sur la chaîne Sentosa® (Vela Diagnostics) avec le *Kit Sentosa SQ HIV genotyping*. Les mutations de résistance du VIH-1 aux principaux antirétroviraux ont été interprétées en utilisant l'algorithme de l'ANRS (v30).

Résultats : Au total, 60 échantillons provenant de 12 patients (12 prélèvements) ont été analysés à raison de 5 échantillons par patient. Un coefficient de variation (CV) allant de 23 à 89% a été observé pour la charge virale ADN VIH-1 dans un même prélèvement. Un séquençage optimal a été obtenu pour 49 échantillons. A un seuil de 20%, et en considérant l'ensemble des échantillons, le nombre de patients possédant au moins une mutation était de 8, 11 et 5 respectivement au niveau du gène de transcriptase inverse, de la protéase et de l'intégrase. Des discordances entre les différents échantillons d'un même patient ont été observées pour 5, 3 et 3 patients au niveau de ces 3 régions. De même, en prenant en compte l'ensemble des échantillons, le nombre de patients avec une résistance (ou résistance possible) à au moins une molécule était respectivement de 4, 6, 6 et 2 pour les INTI, les INNTI, les IP et les INI. Des discordances dans l'interprétation pour ces différentes régions ont été observées chez 3, 3, 2, et 2 patients. Plusieurs discordances majeures sont dues à la présence de mutations associées à des virus défectifs.

Conclusion : Des discordances significatives en termes de mutations de résistance peuvent être observées dans l'analyse de plusieurs échantillons issus du même prélèvement chez certains patients. Ces différences peuvent influencer les choix thérapeutiques, même si des études sont encore nécessaires pour déterminer l'impact de ces mutations présentes dans l'ADN VIH-1.

Membres du jury :

Président :	Madame le Professeur GOFFARD Anne
Assesseurs :	Monsieur le Professeur SENDID Boualem Madame le Docteur BOCKET Laurence Monsieur le Docteur ROBINEAU Olivier
Directeur de thèse :	Monsieur le Docteur ALIDJINOU Enagnon Kazali

