THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

SPECIALITE
COMPLEXITE DU VIVANT

PRESENTEE PAR
DJENEBA BOCAR FOFANA EP KAMPO

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L"UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse : BASES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE DES VIH-1 DE SOUS-TYPES NON B AUX NOUVEAUX ANTIRETROVIRAUX

Soutenue le 21 Octobre 2014

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Christine Katlama	**Président**
Madame le Docteur Constance Delaugerre	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur Avelin Aghokeng	**Rapporteur**
Madame le Professeur Diane Descamps	**Examinateur**
Monsieur le Professeur Ousmane Koita	**Examinateur**
Madame le Docteur Anne-Geneviève Marcelin	**Directeur de thèse**

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au ***Professeur Henri Agut*** *pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

Je remercie Madame le Professeur ***Christine Katlama*** *d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, mais également pour son investissement personnel pour la réalisation des projets de coopération avec les pays du Sud, en particulier le Mali.*

Que les ***Docteurs Constance Delaugerre et Avelin Aghekong*** *trouvent ici toute ma gratitude pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.*

Merci également aux examinateurs qui ont accepté de juger ce travail, ***Madame le Professeur Diane Descamps et Monsieur le Professeur Ousmane Koita.***

Je remercie énormément le ***Docteur Anne-Geneviève Marcelin****, ma directrice de thèse, grâce à qui j'ai pu mener à bien ces travaux de thèse mais également mon master2. Un grand MERCI pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour ses précieux conseils, ses compétences scientifiques, mais également pour son soutien de tout genre.*

Je remercie particulièrement le ***Professeur Vincent Calvez*** *pour m'avoir donné l'opportunité de venir étudier en France et surtout d'intégrer son équipe. Merci pour ses riches conseils et son aide.*
Je le remercie avec ***Anne-Geneviève*** *de m'avoir permis de travailler sur sujet qui me tient tant à cœur. C'est un rêve d'enfance pour moi qui s'est réalisé ! Je vous remercie pour votre collaboration et votre soutien dans la formation de biologistes maliens. Trouvez ici chers amis l'expression de ma gratitude et de mon profond respect. J'espère rendre de nombreux services dans ce domaine de virologie combien passionnante à travers des compétences acquises auprès de vous et de votre équipe.*

J'espère encore partager de nombreux projets scientifiques avec VOUS!

Je remercie chaleureusement ***Cathia Soulié*** *pour sa gentillesse, son soutien, sa disponibilité ainsi que pour son investissement dans mon encadrement, ses conseils avisés tout au long de mes années de formations, mais également pour la correction de ce manuscrit. J'ai apprécié particulièrement ton sens du travail bien fait et tes compétences scientifiques ainsi que tes valeurs humaines. Que le ciel t'assiste à tout moment!*

J'exprime ici toute mon amitié à ***Sidonie Lambert-Niclot et Isabelle Malet*** *pour leurs collaborations dans les différents travaux de cette thèse ainsi que pour leurs soutiens lors de la rédaction de ce document.*

Merci à toute l'équipe VIH : ***Adélie, Eve, Marc, Nathalie, Sophie*** *pour leurs soutiens et amitiés !*
Un grand merci à l'ensemble des ***techniciens*** *du laboratoire de virologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et plus particulièrement Zaïna Ait-Arkoub pour son investissement dans la mise en place du séquenceur au Mali. Merci à Isabelle Cousin pour sa gentillesse....*

*Mes hommages au Professeur,****Feu Anatole Tounkara****, une bibliothèque qui s'est brulé comme on le dit au Mali, nous ne t'oublierons pas cher Professeur.*

*A mes amis et collaborateurs****, Aicha, Almoustapha, Diakité, Gouro, Ibrahima Guindo, Lisa, Mahamoud, Natalie Barracq, Sako, Slim, Philippe Louasse****….*

A mes parents,

A mes beaux parents

A mon mari,

A ma fille,

Aux familles ***ETCHEVERRY, RABBAS, DIOMBANA, KAMPO et FOFANA***

RESUME

La disponibilité des antirétroviraux, ARV pour traiter les patients infectés par le VIH a été l'un des plus grands défis de santé publique ces dernières années. Actuellement, de nouveaux ARV sont en cours de développement ou déjà disponibles, comme les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse de deuxième génération, les inhibiteurs d'intégrase et les inhibiteurs d'attachement (inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule). Cependant, le succès à long terme de ces traitements se heurte à plusieurs problèmes, dont l'émergence de souches résistantes du VIH aux ARV. Alors que les connaissances portent essentiellement sur le VIH-1 prévalent dans les pays du Nord, le sous-type B, la majorité des infections mondiales à VIH est causée par les sous-types non B, majoritairement présents dans les pays du Sud. L'accès aux ARV étant de plus en plus important dans les pays du Sud, il est donc important d'étudier les bases moléculaires de la résistance des VIH-1 de sous-type non-B. Dans une première partie de cette thèse, nous avons évalué la résistance primaire chez des patients infectés par le VIH dans deux contextes différents de prise en charge, au Sud (Mali) et au Nord (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, France). Les résultats montrent une augmentation de la résistance primaire au cours du temps au Mali, probablement liée à un accès élargi aux ARV. Nous avons également observé une fréquence de mutations de résistance plus élevée chez les virus de sous-type non-B *versus* sous-type B. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons caractérisé les profils de résistance génotypique chez des patients sous traitement de première ligne depuis au moins trois ans au Mali. Nous rapportons un niveau élevé de résistance aux inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse de première et de seconde génération. Enfin, dans la troisième partie de cette thèse nous nous sommes intéressés à l'étude du polymorphisme au niveau des codons nucléotidiques codant pour les acides aminés impliqués dans la résistance aux nouvelles molécules. Nous avons d'abord comparé la barrière génétique à la résistance entre les sous-types B et CRF02_AG pour la rilpivirine et l'étravirine, inhibiteurs de la transcriptase inverse de deuxième génération. Puis, nous avons comparé la barrière génétique entre le sous-type B et différents sous-types non B (C, D, CRF02_AG et CRF01_AE) pour l'inhibiteur d'attachement, BMS-626529.Les résultats montrent que la barrière génétique des sous-types non B est proche de celle du sous type B pour ces nouvelles molécules.

Mots clés : barrière génétique, résistance primaire, sous-types de VIH-1, nouvelles molécules

Molecular basis of non-B subtypes of HIV-1 resistance to new antiretrovirals

ABSTRACT

The availability of antiretroviral therapies, ART to treat HIVinfected patients has been one of the greatest public health concerns in the recent years. Currently, new ART are under development or already available, such as non-nucleoside reverse transcriptase second-generation,integrase inhibitors and attachment inhibitors (inhibitors of viral entry into the cell). However, the long-term success of these treatments faces several challenges, including the emergence of resistances to ART. Also, while most available data being focused on the subtype B of HIV-1 (themost prevalent in northern countries), the majority of HIVcases worldwide are caused by the non-B subtypes, mostly in the South. Access to ARTin this part of the World is significantly and regularly increasing, and therefore highlights again the need to study the molecular basis of resistance of that subtype non-B of HIV-1.
In the first part of this thesis, we evaluated the primary resistance withHIV infected patients in two different contexts of health care, South (Mali) and the North (Pitié-Salpêtrière, France). The results show an increase in primary resistance over time in Mali, probably due to an expanded access to ART in the country. We also observed a higher frequency of resistance mutations in virus non-B subtype compared to thesubtype B. In the second part of this work, we characterized the genotypic resistance profiles in patients that received first-line treatment for at least three years in Mali. We found a high level of resistance to non-nucleoside reverse transcriptase first and second generations. Finally, in the third part of this thesis we were interested in studying the nucleotide polymorphism of codons encodingamino acids involved in new drugsresistances. We first compared the genetic barrier to resistance between subtypes B and CRF02_AG for rilpivirine and etravirine, inhibitors of reverse transcriptase second generation. Then, we compared the genetic barrier between subtype B and different non-B subtypes (C, D, CRF01_AE and CRF02_AG) for the attachment inhibitor, BMS-626529. The results show that the genetic barrier of non-B subtypes is similar to those of subtype B for these new molecules.

Keywords: genetic barrier, primary resistance, sub-types of HIV-1, new molecules

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
ABC	abacavir
ADN	acide désoxyribonucléique
AMM	autorisation de mise sur le marché
ANRS	agence nationale de recherche sur le SIDA
APV	amprénavir
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Asn	asparagine (N)
Asp	acide aspartique (D)
ATP	adénosine 5'-triphosphate
ATU	autorisation temporaire d'utilisation
ATV	atazanavir
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine, zidovudine
BAF	barrier to autointegration factor
BIV	bovine immunodeficiency virus
CA	protéine de capside = p24
CCR5	récepteur de chimiokines CCR5
CD4	Lymphocyte T CD4+
CD8	Lymphocyte T CD8+
CI_{50}/CI_{90}	concentration d'inhibiteur permettant d'atteindre 50%/90%d'inhibition de réplication virale
CPA	cellules présentatrices d'antigène
CPI	complexe de préintégration
CRF	« *circulating recombinant form* »
CXCR4	récepteur de chimiokines CXCR4
CYP3A	isoenzyme 3A du cytochrome P450
d4T	2',3'didéhydro-3'-déoxythymidine, stavudine
ddI	didéoxyinosine, didanosine
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
ddNTP	2',3'-didésoxynucléotide 5'-triphosphate
DRV	darunavir
EFV	efavirenz
env	«*envelope*»
ETR	étravirine
EVG	elvitégravir
ESTHER	Ensemble pour une Solidarité Hospitalière en réseau
FIV	Felineimmunodeficiency virus
fosAPV	fosamprénavir
FTC	emtricitabine
gag	«*group-specificantigen*»
Gln	glutamine (Q)
Gly	glycine (G)
gp	glycoprotéine
GSS	genotypic sensitivity score
HAART	highly active antiretroviral therapy
HMG1	high mobility group protein B1
HR1 et 2	heptadrepeatregion 1 et 2
IAS-USA	international AIDS society USA
IDV	indinavir

Ile	isoleucine (I)
IN	intégrase
INI	inhibiteur de l'intégrase
INNTI	inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
INRSP	institut national de recherche en santé publique
IP	inhibiteur de protéase
kDa	kilodalton
LEDGF	lens épithélium derived growth factor
Leu	leucine (L)
LPV	lopinavir
LTR	«*long terminal repeat*»
Lys	lysine (K)
MA	protéine de matrice = p17
Mg++	ions magnésium
MVC	maraviroc
nef	«*negative factor*»
NC	protéine de nucléocapside = p7
NVP	névirapine
OH	hydroxyle
P	phosphate
PM	poids moléculaire
PCR	« *polymerasechainreaction* »
pol	«*polymerase*»
PR	protéase
R	séquence répétée
RAL	raltégravir
rtv	ritonavir
rev	«*regulator of virion expression*»
RTV	ritonavir
RVA	« *recombinant virus assay* »
SEREFO	Centre de Recherche sur le VIH et la Tuberculose
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	simianimmunodeficiency virus
SOLTHIS	solidarité Thérapeutique et Initiative contre le SIDA
SQV	saquinavir
T20	enfuvirtide
TAMs	«*thymidine analogue mutations*»
Tat	protéine Transactivatrice
tat	*« transactivator »*
TDF	ténofovir
TI	transcriptase inverse
Thr	thréonine (T)
TPV	tipranavir
3D	trois dimensions
3TC	lamivudine
Tyr	tyrosine (Y)
U3	élément de séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARN viral
U5	élément de séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARN viral
URF	« *Unique Recombinant Form* »
Val	valine (V)
VCV	vicriviroc
vif	«*viral infectivity factor*»

VIH-1	virus de l‟immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	virus de l‟immunodéficence humaine de type 2
vpr	«*viral protein r*»
vpu	«*viral prote*

SOMMAIRE

INTRODUCTION **11**

I. VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) **12**
I-1. Structure de la particule virale et organisation génomique du VIH-1 12
I-2. Cycle de réplication 13
a. Rôle de la transcriptase inverse du VIH 15
b. Histoire naturelle de la maladie 16
c. Cellules cibles et réservoirs du VIH-1 18

II. DIVERSITE GENETIQUE DU VIH **18**

II-1. Classification et sous-types circulants 19
II-2.Epidémiologie 24

III. TRAITEMENTs ANTIRETROVIRAUX **25**

III-1. Principe et Objectifs du traitement 25
III-2. Classes thérapeutiques et molécules antirétrovirales 26
a. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs) 26
b. Les inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse (INNTIs) 27
c. Les inhibiteurs de la protéase (IP) 27
d. Les inhibiteurs de l"intégrase (INI) 28
e. Les inhibiteurs d"entrée (IE) 29
III-3. Les recommandations pour traiter 32
a. Quand traiter 32
b. Comment traiter 32
III-4. Echecs thérapeutiques 35

IV. RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX **36**

IV-1.Origine de la résistance aux antirétroviraux 36
IV-2. Mécanismes de la résistance aux antirétroviraux 37
a. Resistance aux INTIs 37
b. Resistance aux INNTIs 41
c. Resistance aux IP 42
d. Resistance aux INI 44
e. Resistance aux inhibiteurs de fusion 45
f. Resistance aux inhibiteurs du CCR5 45
IV-3. Barrière génétique à la résistance 45
IV-4. Conséquence de la diversité génétique des sous-types non-B sur la résistance 48

V. EVALUATION DE LA RESISTANCE **50**
V-1. Les tests génotypiques 50
V-2. Les tests phénotypiques 51
V-3. UTILISATION DES TESTS DE RESISTANCE 51

VI. PROBLEMATIQUES D'ACCES AUX TRAITEMENTS DANS LES PAYS DU SUD **52**
VII. CONTEXTE MALIEN **53**

OBJECTIFS **57**

RESULTATS **59**

Article 1 51

Résistance aux antirétroviraux transmise chez des patients infectés par le VIH-1 nouvellement diagnostiqués et non traités à Ségou et à Bamako, Mali.

Article 2 61

Prévalence de mutations préexistantes associées à la résistance à la rilpivirine, emtricitabine et au tenofovir chez les patients naïfs d'antirétroviraux infectés par les sous-types B et non B du VIH-1.

Article 3 63

Haut niveau de résistance chez des patients en échec thérapeutique sous première ligne de longue durée au Mali.

Article 4 65

Comparaison de la barrière génétique à la résistance pour la rilpivirine et l'étravirine entre les sous-types B et CRF02_AG.

Article 5 67

Barrière génétique à la résistance pour l'inhibiteur d'attachement BMS-626529 entre les sous-types B et non-B.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **70**

REFERENCES **87**

ANNEXES **94**

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est le rétrovirus identifié en 1983 comme agent responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise « SIDA » par l'équipe du professeur Montagnier (Institut Pasteur, Paris) (Barre-Sinoussi et al. 1983). Cette épidémie s'est rapidement révélée être une pandémie et, 30 ans après la découverte du virus, 35 millions de personnes dans le monde en étaient porteuses fin 2012, près de deux tiers d'entre elles en Afrique Sub-Saharienne (ONUSIDA : http://www.unaids.org), en hausse par rapport à 2001. Cela reflète un nombre important de nouvelles infections, ainsi qu'une expansion significative de l'accès au traitement antirétroviral (Kantor et al.) qui a contribué à réduire les décès liés au SIDA. Actuellement, il n'existe pas de vaccin efficace. La prévention et le traitement antirétroviral restent les armes de choix pour faire face à cette infection. Depuis 1996 avec l'instauration des trithérapies «hautement active» ou HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) comprenant les Inhibiteurs de Protéase (IPs) et les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTIs), la morbidité et la mortalité liées au VIH ont considérablement diminué dans les pays du monde, au Nord comme au Sud. Le nombre de molécules anti VIH est ainsi passé d'un composé en 1987 à plus de 25 antirétroviraux ce jour permettant, grâce à de nombreuses combinaisons possibles, de mieux contrôler la maladie. En plus d'améliorer la qualité de vie et de réduire les décès liés au SIDA, le traitement antirétroviral est désormais reconnu comme un moyen de prévention de la transmission du VIH à travers la réduction de la charge virale((UNAIDS) 2013). Cependant, il existe une très grande disparité dans l'accès aux traitements entre les pays industrialisés et les pays en développement (PED), ces derniers n'y ayant eu accès que très tardivement, et de façon encore très limitée en ce qui concernent les nouvelles molécules. Ainsi, les nombreux progrès thérapeutiques des 10 dernières années et l'avènement de nouvelles classes antirétrovirales comme les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs d'intégrase et les inhibiteurs du co-récepteur CCR5 ont permis de transformer l'issue de cette maladie rapidement mortelle en une maladie chronique pouvant être contrôlée. L'utilisation de ces nouvelles classes est à ce jour limitée aux pays développés. Bien que l'objectif principal pour les pays du Sud soit l'accès aux traitements du plus grand nombre de personnes infectées, il est important de tenir compte de l'expérience des pays du Nord sur la question de la résistance aux traitements, qui est un point clé dans la prise en charge d'un patient infecté par le VIH.

Malgré des progrès spectaculaires, beaucoup d'efforts doivent être réalisés dans les domaines de la prévention, du dépistage et de la prise en charge (accès aux traitements et suivi virologique) dans les pays, et plus particulièrement dans les pays du Sud.

I. VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

Le VIH-1 appartient à la famille des *Retroviridae* dont les virus se distinguent par la présence d'une enzyme virale caractéristique : la Transcriptase Inverse (TI). Il appartient à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *lentivirus*. Ce genre regroupe un grand nombre de virus non oncogènes qui provoquent la mort des cellules infectées et qui sont responsables de maladies à évolution lente. Ils infectent différentes espèces animales dont les primates (VIH, SIV), les félins (FIV) ou encore les bovins (BIV). A côté du VIH-1 responsable d'une pandémie mondiale, un deuxième virus, le VIH-2, est présent essentiellement en Afrique de l'Ouest.

I-1. STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE ET ORGANISATION GENOMIQUE DU VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 90 à 120 nanomètres de diamètre, produit par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule hôte. Son enveloppe contient des trimères de deux glycoprotéines (Trottier B MN) virales : la glycoprotéine transmembranaire gp41 associée à la glycoprotéine extra membranaire gp120. L'enveloppe protège la capside interne ou « core » du virus qui renferme une matrice (MA) composée de protéines p17 puis une capside (CA) composée de protéines p24. Le génome du VIH-1, contenu dans la capside et associé à la nucléocapside (NC, p7), est constitué de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive, liées de façon non covalente en 5'. Les trois enzymes virales indispensables à la réplication : la TI, l'intégrase (IN) et la protéase (PR) sont contenues, elles aussi, dans le core viral (**Figure 1**)

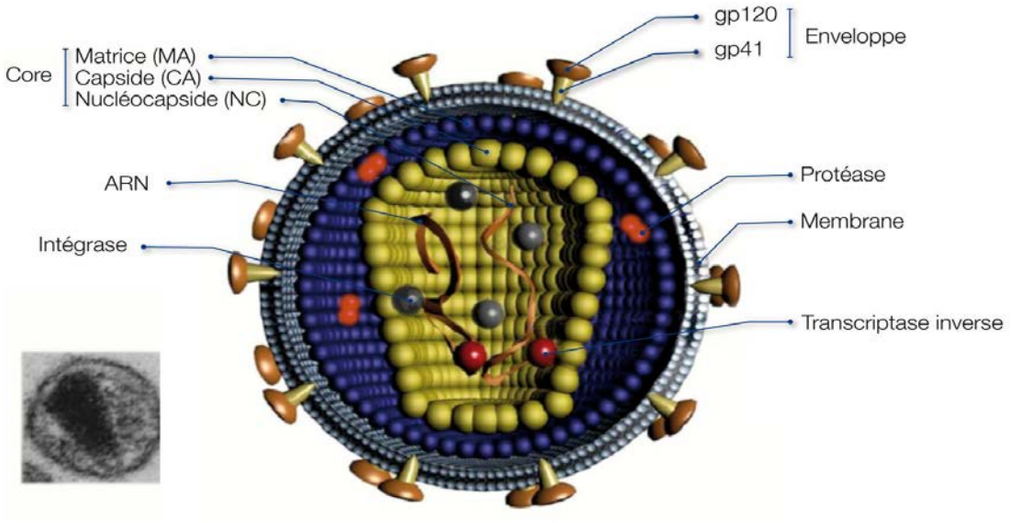


Figure 1. Structure de la particule virale infectieuse du VIH-1

Source (http:/imagessvt.free.fr/dessins/sessins2.html)

Le génome du VIH-1 est constitué de trois gènes principaux appelés gag « group-specificantigen », pol« polymerase » et env « envelope ». Ils définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus. Le gène gag code les protéines de structure (MA, CA et NC), le gène pol, les protéines nécessaires à la réplication virale (PR, TI et IN) et le gène env, les glycoprotéines d'enveloppe (gp120 et gp41). Six autres gènes, situés entre *pol* et *env*, codent pour des protéines régulatrices de l'expression des protéines virales qui sont tat, rev, vif, vpr, vpu et nef. Ces protéines, dites auxiliaires, sont essentielles à la réplication virale *in vivo*. (**Figure 2**). Le génome du VIH-1 est constitué d'environ 9200 nucléotides (nt). L'ARN viral, coiffé en 5' et polyadénylé en 3', est encadré par deux courtes séquences répétées R (« repeat ») adjacentes aux séquences uniques U5 et U3 présentes respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARN.

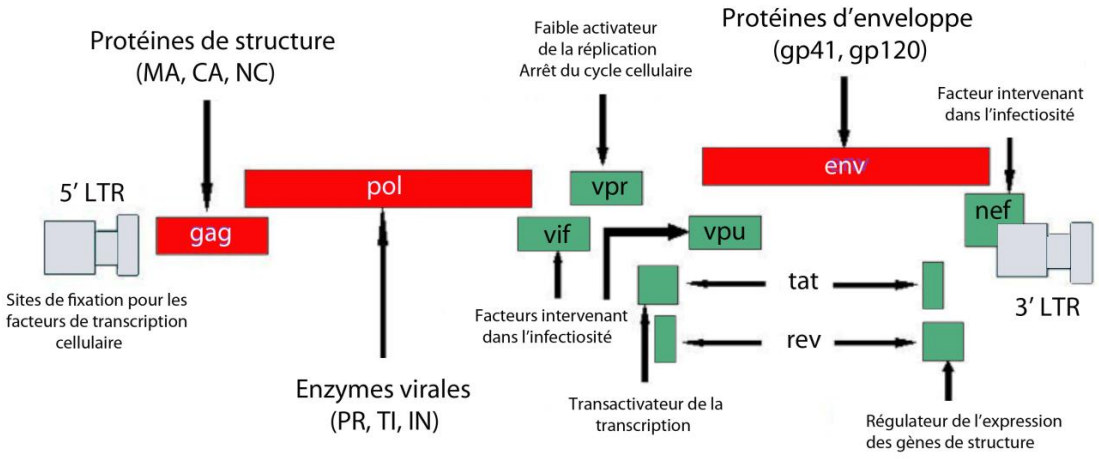


Figure 2. Organisation génomique du VIH-1

I-2. Cycle de réplication du VIH

Le VIH-1 est caractérisé par sa très grande capacité réplicative. Dans son cycle viral, trois enzymes virales (PR, TI et IN) constituent le moteur moléculaire de la réplication du virus. Ce cycle peut être divisé en deux phases.

La phase dite précoce correspond à l'entrée du virus dans la cellule, conséquence d'une reconnaissance entre la glycoprotéine gp120 virale et son récepteur spécifique présent à la surface de la cellule cible, la molécule CD4. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel de la gp120 qui permet à une région spécifique, la boucle V3

d'interagir avec des corécepteurs (CCR5 et CXCR4) également présents à la surface de la membrane cellulaire. Cette interaction met en contact une autre glycoprotéine, la gp41 virale avec la membrane cellulaire et il en résulte la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. La capside du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule et débute la rétro-transcription du génome viral. Brièvement, l'ARN viral est rétro-transcrit dans le cytoplasme en ADN double-brin (ADN proviral) grâce à la TI. L'ADN nouvellement synthétisé (provirus ou ADNc) est lié à un complexe supramoléculaire protéique : le PIC ou complexe de pré-intégration qui contient la TI, l'IN, la protéine de matrice et Vpr, est alors orienté vers le noyau de la cellule. Ces trois dernières protéines semblent jouer un rôle majeur dans l'import nucléaire. Le provirus est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase.
La phase tardive va conduire à la libération de nouveaux virus par la cellule, dépendant du type et de l'état d'activation de la cellule infectée. Cette phase du cycle correspond donc, aux étapes permettant d'obtenir des virions complets, capables de bourgeonner et de maturer après leur libération dans le milieu extracellulaire. Le virus utilise alors la machinerie cellulaire pour se répliquer : la transcription de l'ADN proviral en ARN génomique est assurée en effet par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Deux protéines virales interviennent alors : tat qui régule l'élongation de la transcription et rev qui joue un rôle dans le transport de l'ARN génomique complet ou épissé vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les ARN messagers viraux de différentes tailles codent pour les polyprotéines env ou gag/pol et pour les protéines accessoires. Après l'assemblage de ces polyprotéines virales et l'encapsidation de l'ARN viral, les nouvelles particules formées bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire. La maturation des protéines virales est assurée par la protéase virale.

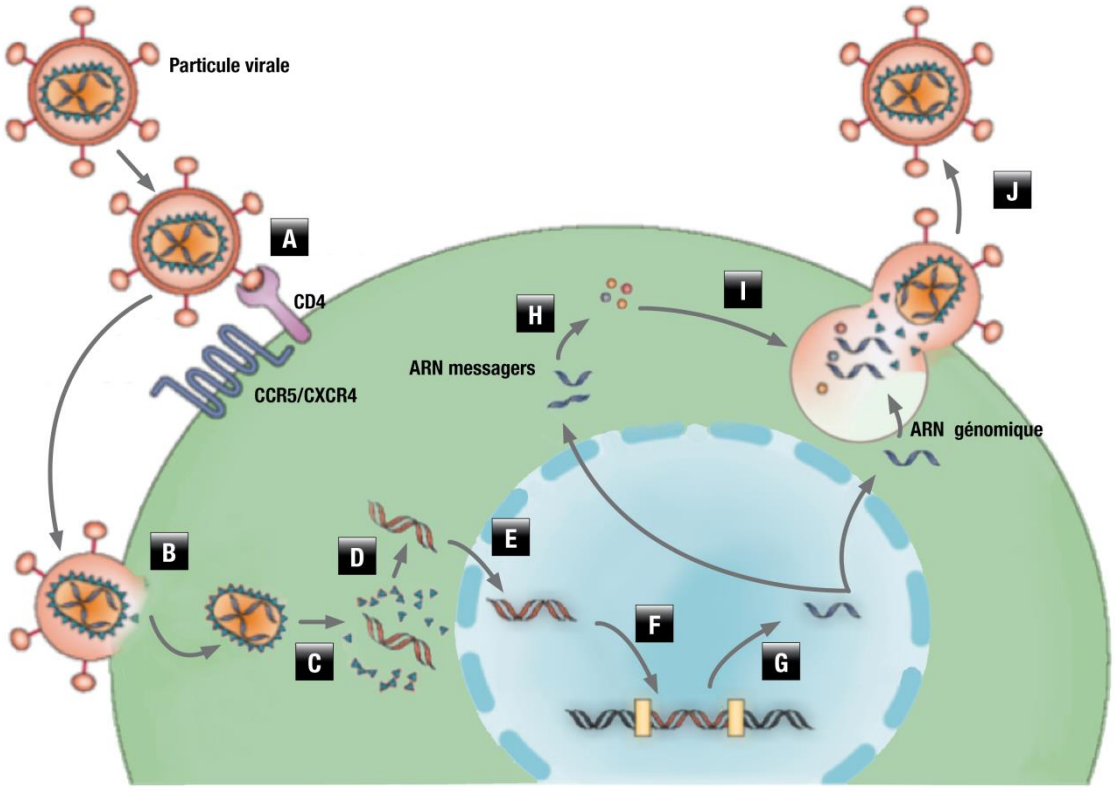


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1 : **A)** Fixation du VIH à la cellule cible, **B)** Fusion des deux enveloppes et entrée du virus dans la cellule, **C)** Décapsidation, **D)**Transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin, **E)** Import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC), **F)** Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule, **G)** Transcription de l'ADN proviral en ARN génomique et ARN messagers , **H)** Traduction des ARN messagers en protéines virales, **I)** Assemblage des nouveaux virions au niveau de la membrane cellulaire, **J)** Bourgeonnement et maturation des nouveaux virions libéré (Han, Y., et al.,2007).

a. ROLE DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE DU VIH

La TI est un hétérodimère formé de deux sous unités (p66 et p51) comprenant respectivement 560 et 440 acides aminés. Alors que la sous-unité p51 a un rôle stabilisateur de la sous-unité p66, seule cette dernière est active. Elle a la forme d'une main ouverte, avec une gorge située entre les doigts, la paume et le pouce et où vient se loger la matrice d'ARN. Le site actif de polymérisation, situé au niveau de la paume, est formé d'un motif de quatre acides aminés (YMDD : tyrosine, méthionine, acide aspartique, acide aspartique) commun à d'autres

polymérases. Dans le noyau de la cellule qui va être infecté par le VIH, le génome est constitué d'ADN. Pour que le virus puisse utiliser son ARN, il doit d'abord le transformer en une double hélice d'ADN. C'est le rôle de la TI. En effet, lors de la réplication virale du VIH, l'ARN viral est rétro-transcrit dans le cytoplasme par la TI en ADN complémentaire ou ADN (-) alors que l'ARN viral est dégradé par une activité ribonucléase H de la TI. C'est lors de cette synthèse d'ADN (-) que la TI, polymérase peu fidèle (car dépourvue d'une activité exonucléase 3' vers 5') introduit des erreurs qui seront à l'origine d'une grande part de la variabilité génétique du VIH. La TI permet ensuite la synthèse du second brin d'ADN ou brin (+), utilisant le brin (-) comme matrice. Une autre enzyme, la RNaseH qui est une enzyme à activité nucléasique va ainsi dégrader l'ARN issu de l'hybride ARN/ADN après la rétrotranscription. Cette enzyme est portée par un domaine de la TI. Dans la cellule hôte, la transcription inverse de l'ARN viral simple brin en ADN double brin génère une duplication des séquences U5 et U3 conduisant à la formation de séquences répétées directes aux deux extrémités du génome : les LTR (« Long Terminal Repeat »), constitués des régions U3, R et U5.

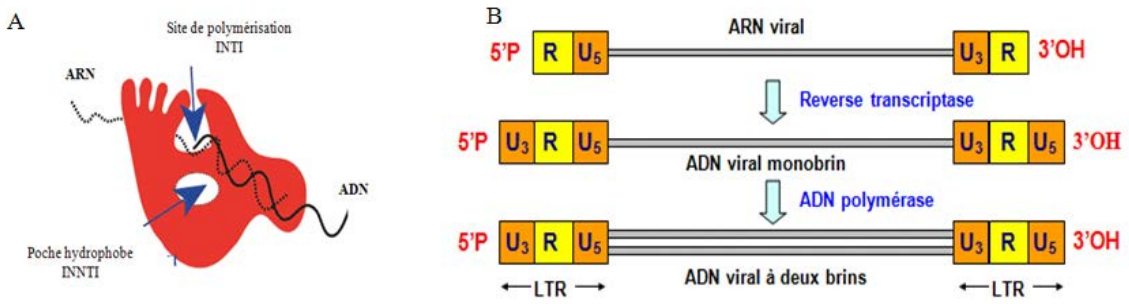


Figure 4. A. Transcriptase inverse et B. Transcription inverse (livre VIH 2014, Javaugue FC).

b. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE

L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1 comporte généralement trois phases de progression : une phase de primo-infection, une phase asymptomatique ou phase de latence clinique et une phase symptomatique qui aboutit au stade SIDA (**Figure 5**).

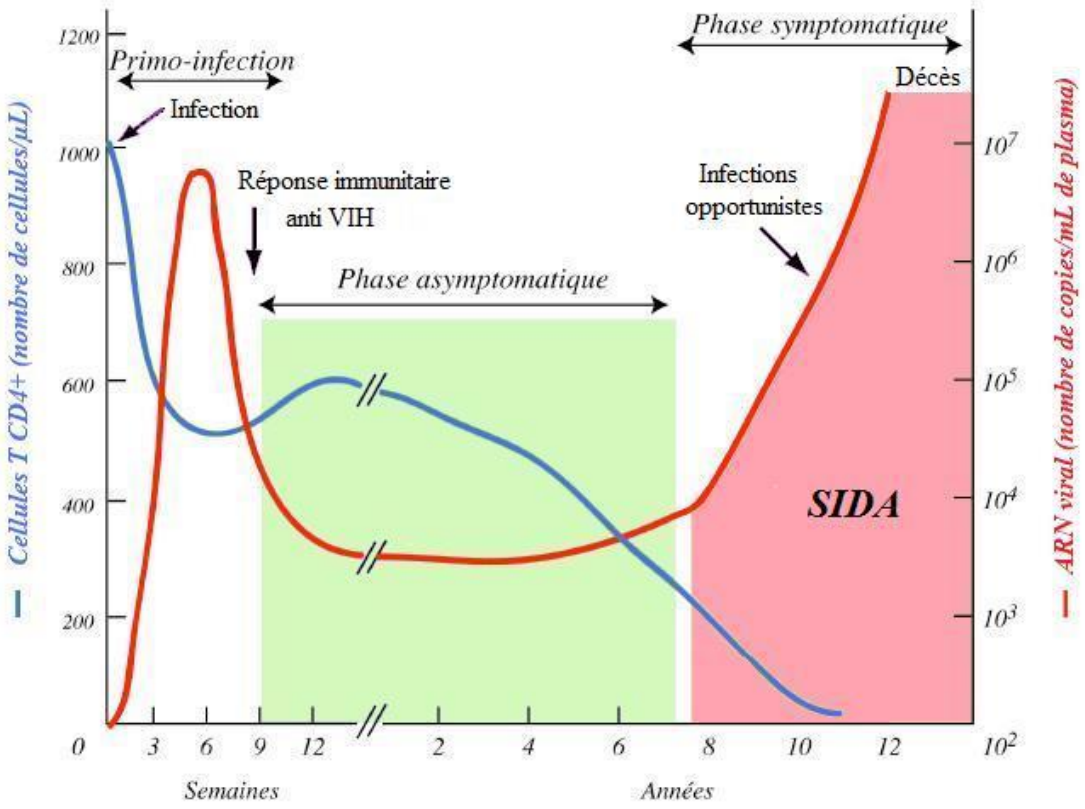


Figure 5. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1(site wikipediaVIH)

La primo-infection est caractérisée par une réplication virale massive au niveau des organes lymphoïdes qui se traduit par un pic de virémie initiale associé à une diminution transitoire de la quantité de lymphocytes T CD4+ circulants dans le sang. La charge virale diminue ensuite alors qu'une réponse immunitaire spécifique T se met en place.

La phase asymptomatique dure en moyenne 10 ans. Elle se caractérise par une stabilisation de la charge virale plasmatique et une diminution très progressive du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants. Durant la phase de latence clinique, le virus continue à se répliquer dans les organes lymphoïdes même si la charge virale plasmatique peut être faible. Il existe un équilibre dynamique entre le taux de réplication du virus, l'élimination des cellules T CD4+ infectées et le renouvellement de ces cellules.

La phase symptomatique se caractérise par une augmentation de la charge virale plasmatique et la chute du nombre de lymphocytes T CD4+. L'infection VIH est une infection persistante chronique due à l'établissement précoce de réservoirs viraux et à la réplication constante du virus *in vivo*, permettant l'émergence de variants viraux capables d'échapper au système immunitaire.

C. CELLULES CIBLES ET RESERVOIRS DU VIH-1

Les cellules sensibles à l'infection du VIH-1 expriment la molécule CD4 à la surface de leur membrane. Ce récepteur a été identifié comme étant le récepteur principal du VIH-1 en 1984 (Klatzmann et al. 1984)mais il est apparu que cette molécule n'était pas suffisante à l'entrée du virus. Plus de 10 ans plus tard, les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 ont été mis en évidence comme co-récepteurs indispensables à l'entrée du VIH-1 dans les cellules (Doranz et al. 1997). C'est la découverte de ces co-récepteurs et leur expression différentielle à la surface des cellules CD4+ qui a permis d'expliquer les différences de tropisme du VIH-1. Ainsi, les virus à tropisme macrophagique utilisent le co-récepteur CCR5 et sont de tropisme R5 et les virus à tropisme lymphocytaire utilisent le co-récepteur X4 et sont de tropisme X4. Les virus capables d'utiliser les deux co-récepteurs sont de tropisme R5/X4.

Parmi les cellules cibles du VIH-1, on retrouve principalement les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (ou *helper*) dans lesquels le VIH se multiplie très rapidement mais aussi les cellules présentatrices d'antigène (CPA) porteuses du récepteur CD4, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans ainsi que les cellules microgliales du cerveau. Dans la plupart de ces cellules présentatrices d'antigène, le VIH se réplique peu. Par contre, les lymphocytes T activés sont le siège d'une réplication virale intense.

II. DIVERSITE GENETIQUE DU VIH

Le processus d'évolution existe chez toutes les espèces vivantes mais celle du VIH-1 se différencie par sa rapidité conduisant à l'existence d'un grand nombre de variants. Dès 1985, il a été montré que la variabilité génétique du VIH-1 était très importante.

Les différents facteurs induisant la grande variabilité du VIH résultent principalement de deux phénomènes :

Des mutations aléatoires fréquentes

Le taux de mutations aléatoires est au moins 1000 fois plus important au niveau du génome du VIH qu'au niveau du génome humain. En effet, la TI qui permet au VIH de se répliquer, est une enzyme qui ne possède pas d'activité exonucléase de 3' vers 5'. Les erreurs

introduites au cours de la transcription inverse sont donc fréquentes et sont estimées à une erreur tous les 10000 nucléotides copiés. Le génome étant composé d'environ 10000 nucléotides, il sera introduit environ une mutation à chaque cycle de réplication. Au sein de l'organisme d'une personne infectée et non traitée, on estime que 10 milliards de virions sont renouvelés chaque jour.
Chez un même individu, le virus est présent sous forme d'une population virale polymorphe avec une multitude de génomes différents (ou « variants »), c'est ce qu'on appelle une «quasi-espèce». Chez le sujet récemment infecté, les virus circulants sont génétiquement très homogènes. Cette population virale va évoluer avec un taux global de changement estimé à 1% par an pour le gène *env* et 0,5% par an pour le gène *gag*. Un mélange complexe de variants va apparaître progressivement et évoluer de façon différente et indépendante au niveau des différents tissus et cellules (Coffin 1995).

Les recombinaisons génétiques

Le phénomène de recombinaison, mis en évidence en 1989 (Clavel et al. 1989), est dû à la capacité de la TI de passer d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la transcription inverse, créant ainsi un ADN recombinant. Ainsi, lorsqu'une seule cellule est infectée par deux virions génétiquement différents, les séquences peuvent donner naissance à des formes recombinantes. Ce processus aléatoire est favorisé par les comportements à risque qui augmentent la probabilité de contaminations multiples chez un même individu.

Les erreurs de la TI et les recombinaisons produisent de nombreux virions différents. Si la plupart des mutations entrainent la production de virions défectifs, certaines d'entre elles confèrent un grand pouvoir d'adaptation permettant au virus d'échapper au système immunitaire de son hôte. Seuls les virions les mieux adaptés seront sélectionnés et se multiplieront dans l'organisme. La prise d'un traitement antirétroviral entrainera également une sélection au sein de la population virale en favorisant les variants les plus résistants à la molécule en cas de réplication virale sous traitement. D'où, l'intérêt des multithérapies efficaces visant ainsi à empêcher toute adaptation du virus.

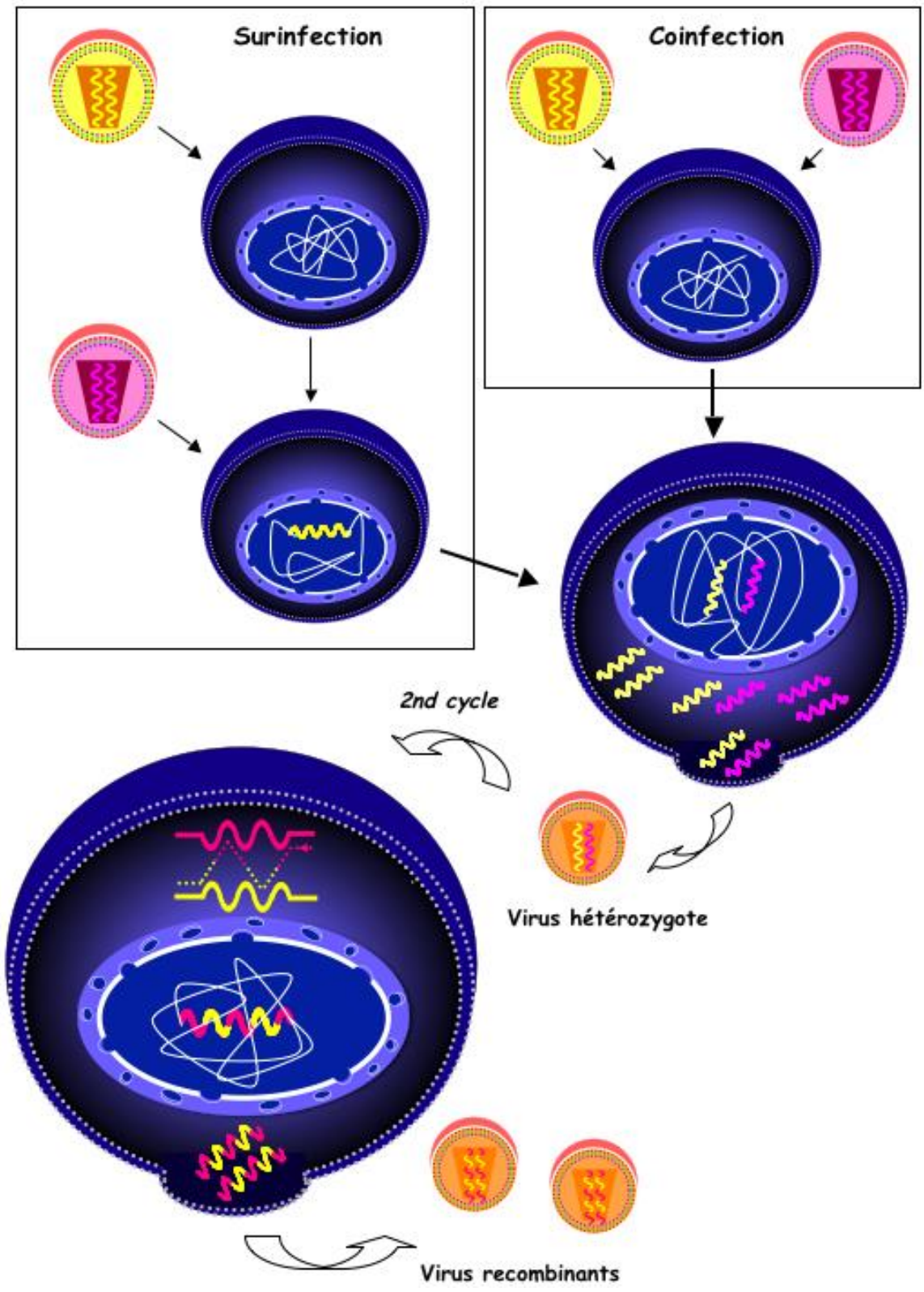


Figure 6. Schéma expliquant la recombinaison génétique du VIH-1. Pendant le 1er cycle, deux virus de sous-type différent, représentés en jaune et rose, infectent simultanément une cellule (coinfection) ou non (surinfection). Le cycle aboutit à la production de virions hétérozygotes. Lors du 2nd cycle, ce virion infecte une nouvelle cellule dans laquelle a lieu la recombinaison pendant la transcription inverse. Il en résulte un ADN proviral chimérique, aboutissant ainsi à la production de virus recombinants. (Thèse de Derache A, UPMC 2008)

II-1. Classification et sous-types circulants

Le VIH est divisé en 2 "groupes", VIH-1 et VIH-2, qui proviennent de deux événements de transmission inter-espèces différents, issus respectivement du chimpanzé et du sooty mangabey. Sur la base des distances génétiques entre les VIH-1 retrouvés chez les patients, ils sont classés en quatre groupes distincts M („*Major*"), N (non-M, non-O), O („*Outlier*") et P, dernier identifié en 2009 (Plantier et al. 2009). Le groupe M regroupe 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) dont le sous-type majoritaire est le sous-type C qui représente près de 50% des infections dans le monde. Des variations génétiques entre les sous-types peuvent exister (25 à 35%) selon les sous-types et les régions du génome considérées (Korber et al. 2001).Il existe également des variations au sein d'un sous-type, entre 15 et 20%, tels que le sous-type F, divisé en sous sous-types F1 et F2, et le sous-type A en A1, A2, A3 et A4 (Meloni et al. 2004; Plantier et al. 2009). La répartition géographique de ces différents sous-types est variable (http://www.hiv.lanl.gov). A titre d'exemple, le sous-type B est prédominant en Europe, en Australie et en Amérique du Nord. Le groupe O et le groupe N, beaucoup plus rares, sont retrouvés principalement au Cameroun. Dans le cas de co-infections ou surinfections par plusieurs sous-types de VIH-1, des phénomènes de recombinaison entre les virus distincts permettent l'émergence de virus recombinants ou « *circulating recombinant form* » (CRF), lorsqu'ils ont été identifiés chez au moins 3 individus non liés épidémiologiquement et caractérisés sur tout le génome(Robertson et al. 2000).Dans le cas contraire, ils sont appelés URF (Unique Recombinant Forms). Le nombre de CRF est en constante évolution et la base de données de Los Alamos en répertorie environ 66 en 2014 (http://hiv-web.lanl.gov). Lorsqu'elles sont composées de plus de 2 sous-types, on parle de CRF complexe ou CRF_*cpx,* par exemple le CRF06_cpx. Les VIH-1 sous types non B sont à l'origine de près de 90% de la pandémie, notamment sur les continents Africain et Asiatique ; ils sont de plus en plus fréquemment responsables de nouvelles infections en Europe, particulièrement les formes recombinantes (Morlat 2013; Peeters et al. 2013). En France, la souche non B la plus fréquente est un recombinant des sous-types A et G: le CRF02_AG.

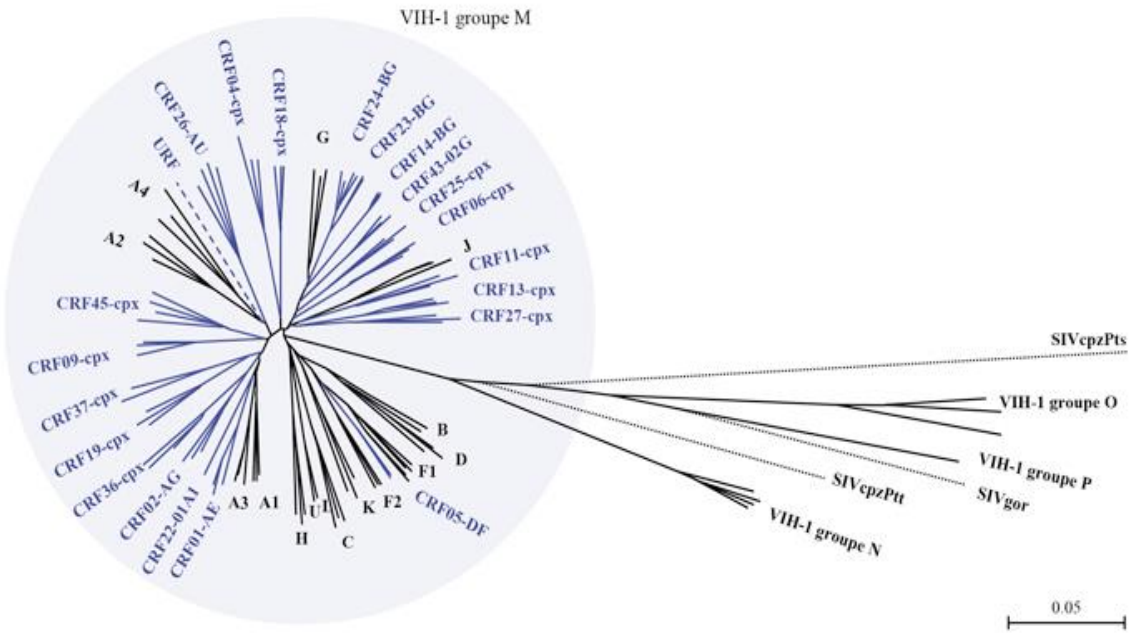


Figure 7. Arbre phylogénétique du VIH-1 et VIS. En bleu sont représentés les différents sous-types du VIH-1 et en noir les groupes de VIH-1 ainsi que les VIS dont ils sont issus. (Peeters et al. 2010).

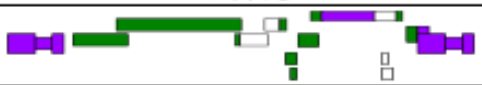
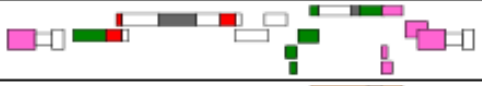
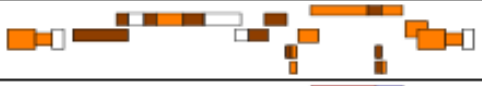
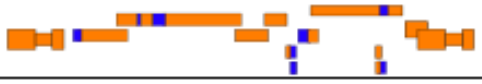
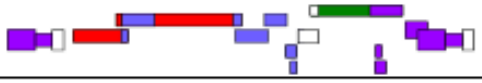
NOM	PROFIL	PAYS
CRF01_AE		Asie du Sud-Est
CRF02_AG		Afrique de l'Ouest et Centrale
CRF03_AB		Ukraine, Russie
CRF04_cpx		Chypre, Grèce
CRF05_DF		République Démocratique du Congo
CRF06_cpx		Afrique de l'Ouest
CRF07_BC		Chine
CRF08_BC		Chine
CRF09_cpx		Sénégal, Ghana
CRF10_CD		Tanzanie
CRF11_cpx		Afrique Centrale
CRF12_BF		Uruguay, Argentine
CRF13_cpx		Cameroun
CRF14_BG		Espagne, Portugal
CRF15_01B		Thaïlande
CRF16_A2D		Kenya, Corée du Sud Argentine
CRF18_cpx		Afrique Centrale, Cuba



Tableau 1. Tableau récapitulant les 18 premiers CRF identifiés ainsi que les régions où ils sont endémiques. Chaque sous-type impliqué dans un recombinant est désigné par une couleur spécifique (http://hiv-web.lanl.gov).

II-2. Epidémiologie

Fin 2012, selon le rapport de l'ONUSIDA 35,3 (32,2-38,8) millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde dont 25 (23,5-26,6) millions d'infection imputable à l'Afrique subsaharienne seule((UNAIDS) 2013).

La répartition des sous-types et recombinants à travers le monde est bien documentée (Taylor and Hammer 2008). Le groupe M du VIH-1 est largement prédominant à travers le monde. Quant aux groupes N, O et P du VIH-1, ils semblent être endémiques au Cameroun et ses pays limitrophes. Au sein du groupe M du VIH-1, la répartition des différents sous-types a été établie. Le sous-type prédominant est le C, représentant 48% des infections dans le monde, la majorité concernant le sud et l'est de l'Afrique, ces pays recensant le plus de personnes infectées par le VIH. Vient ensuite le sous-type A, responsable de 12% des infections, uniformément distribué entre l'est de l'Europe, l'Afrique de l'ouest, de l'est et centrale. Le sous-type B, sous-type le plus étudié, représente 11% des infections et circule en Amérique du nord, Europe de l'ouest et Océanie. Le sous-type D, circulant chez 2% des personnes infectées, cause un nombre significatif d'infections en Afrique centrale, du nord et de l'est. Le sous-type G, retrouvé dans 89% des infections en Afrique centrale et de l'ouest, représente 3% des infections dans le monde. Les sous-types F, H, J et K représentent un faible nombre d'infections à eux 4 (1%) ; ils sont trouvés exclusivement en Afrique sub-saharienne. Le plus grand nombre des infections par le sous-type F est retrouvé en Amérique latine et en Afrique centrale. Enfin, les recombinants du VIH-1 les plus prévalents sont les CRF02_AG et CRF01_AE respectivement majoritaires en Afrique et en Asie. Ces recombinants deviennent de plus en plus prévalents dans les pays du Nord, comme la France. Le VIH-2, caractérisé par sa lente progression vers le SIDA chez un sujet infecté, est retrouvé principalement en Afrique de l'ouest, région où le sooty mangabey vit.

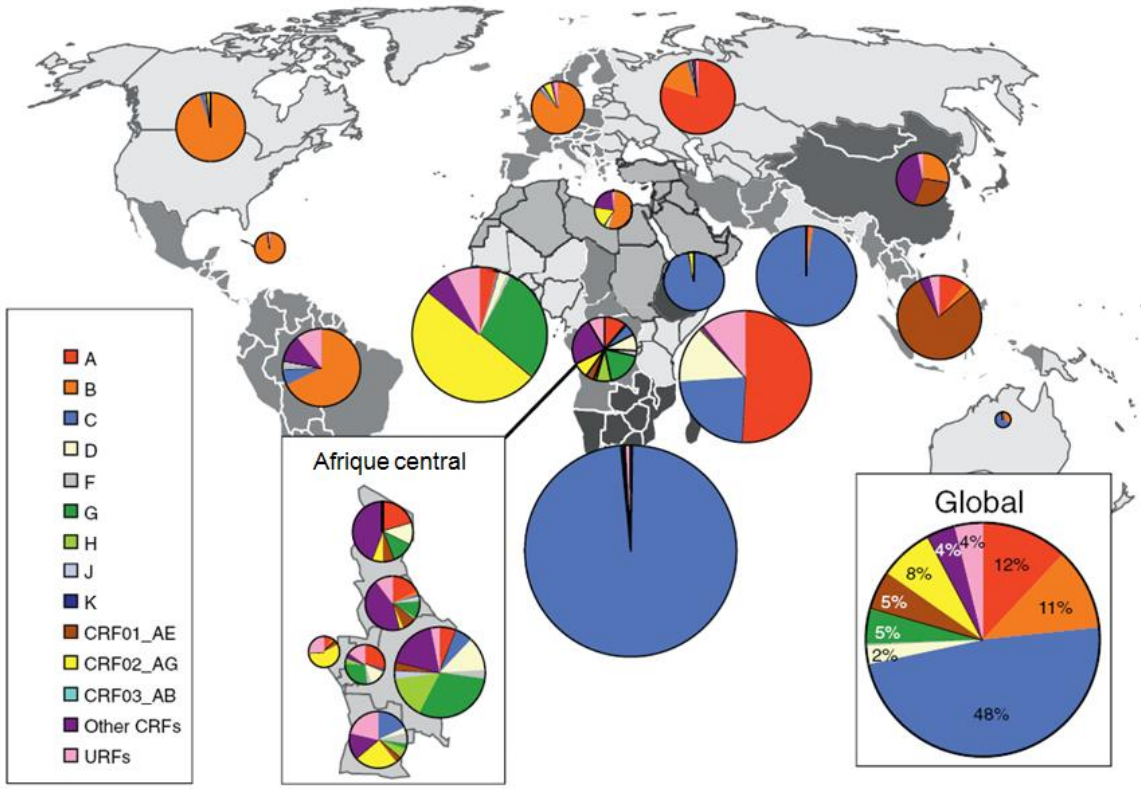


Figure 8. Distribution mondiale actuelle des sous-types du VIH-1 et de ses formes recombinantes (Hemelaar 2012).

III. TRAITEMENTS ANTIRETROVIRAUX

La seule stratégie actuelle permettant de transformer le pronostic sombre du stade SIDA est l'utilisation de traitements antirétroviraux. En effet, depuis l'avènement de ces molécules, une forte diminution de la morbidité et de la mortalité de la maladie a été observée. L'utilisation de ces antirétroviraux a également permis de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection par le VIH.

III-1. PRINCIPE ET OBJECTIFS DU TRAITEMENT

Le but d'un traitement antirétroviral est de bloquer simultanément plusieurs étapes du cycle viral de manière à empêcher la réplication virale et de prévenir l'émergence de variants viraux

résistants. Pour atteindre cet objectif, le traitement doit rendre la charge virale sous la limite de détection (CV < 50 copies/ml, seuil de consensus) afin de limiter la destruction des lymphocytes T CD4+ infectés et de permettre la régénération effective de nouvelles cellules CD4. En effet, le système immunitaire doit être préservé ou restauré avec, comme objectif immunologique, un retour à des valeurs normales de la numération des lymphocytes CD4 ou plus modestement le retour à des CD4 au-dessus de 500cellules/mm^3. Dans la collaboration européenne de cohortes COHERE, la mortalité des hommes ayant un nombre de CD4 500cellules/mm^3 depuis plus de 3 ans est comparable à celle des hommes de la population générale(Morlat 2013). D'un point de vue virologique, l'arrêt de la réplication virale est nécessaire afin de ne pas sélectionner les virus résistants qui entraîneraient un rebond de la charge virale(Yeni 2010). A ce jour, il existe près de 27 molécules approuvées et différentes combinaisons lesquelles ont prouvé leurs efficacités. Ces associations puissantes appelées HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ont montré une considérable efficacité tant sur le plan clinique que virologique et immunologique. Pour évaluer l'efficacité de ces traitements, la mesure de la charge virale plasmatique reste le meilleur marqueur.

III-2. CLASSES THERAPEUTIQUES ET MOLECULES ANTIRETROVIRALES

Il existe six classes thérapeutiques contenant plusieurs molécules antirétrovirales.

a. Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)

Les INTIs constituent la première classe antirétrovirale mise sur le marché avec la zidovudine (AZT) en 1987 pour le traitement de l'infection à VIH et restent largement utilisés dans la thérapie antirétrovirale en combinaison avec les autres classes (INNTI, IP, IE et INI).

Les molécules appartenant à cette famille agissent durant la phase précoce du cycle de réplication virale par inhibition de la TI. Les INTI sont des analogues des nucléosides naturels, privés de groupement hydroxyl en 3' (didésoxynucléosides ou ddNTP), les empêchant d'assurer la liaison 5'-3' avec le nucléoside suivant. Ils sont ainsi appelés « terminateur de chaîne » (Furman et al. 1986). Ces dérivés entrent en compétition avec les nucléosides naturels et sont incorporés dans le premier brin d'ADN proviral lors de sa synthèse par la transcriptase inverse. L'arrêt de la synthèse d'ADN viral correspond à l'effet antiviral. Les INTIs constituent des prodrogues qui, une fois dans la cellule, subissent une triphosphorylation par des kinases cellulaires pour être actifs. Le ténofovir (TDF), commercialisé en 2002, est le seul représentant actuel des dérivés nucléotidiques dont la

particularité est d'être déjà monophosphorylé ce qui présente l'avantage de ne nécessiter que deux étapes de phosphorylation intracellulaire. Les INTI actuellement commercialisés sont au nombre de sept : l'AZT, le didanosine (ddI), la stavudine (d4T), l'abacavir (ABC), la lamivudine (3TC), l'emtricitabine (FTC) pour les analogues nucléosidiques et le ténofovir (TDF) pour les analogues nucléotidiques.

b. **Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs)**

De structure chimique différente des INTIs, ils ont une activité inhibitrice importante sur la TI du VIH-1, alors qu'ils sont inactifs sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O. A la différence des analogues nucléosidiques, ils inhibent la TI de façon non compétitive, en se fixant au niveau d'une poche hydrophobe située à proximité du site catalytique de l'enzyme. Les INNTIs ont la particularité d'être métabolisés de façon prédominante par le foie avec une demi-vie longue permettant une prise unique quotidienne. Les INNTIs actuellement commercialisés sont au nombre de quatre. Les molécules de première génération, dont la barrière génétique est faible et présentant des résistances croisées, sont la névirapine (NVP) et l'éfavirenz (EFV). Les molécules de deuxième génération dont le chef de file est l'étravirine (ETR) capable d'inhiber des virus porteurs de mutations de résistance aux inhibiteurs de première génération lorsqu'il est associé à des antirétroviraux pleinement actifs. La rilpivirine (RPV), nouvelle molécule de deuxième génération a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché chez les patients naïfs d'antirétroviraux. Cette nouvelle molécule semble avoir une barrière génétique plus faible(Madruga et al. 2007; Rimsky et al. 2012).

c. I**nhibiteurs de la protéase (IP)**

L'apparition de cette classe d'antirétroviraux dès 1996, a constitué un événement majeur dans le développement de nouvelles stratégies antirétrovirales. A l'inverse des inhibiteurs de la TI agissant pendant la phase précoce de l'infection, les IP bloquent la phase tardive de maturation virale, protéines virales nouvellement synthétisées. Les IP actuellement disponibles agissent comme des peptidomimétiques (à l'exception du tipranavir) qui se lient compétitivement sur le site actif de la protéase empêchant le clivage des polyprotéines Gag et GagPol. Ainsi, en présence d'IPs, les virions immatures produits sont incapables d'infecter de nouvelles cellules. L'efficacité et la puissance des IP ont rapidement permis un meilleur contrôle de la charge virale. Ces composés ont tous un métabolisme hépatique utilisant la voie

des cytochromes CYP3A. Ils sont donc l'objet d'interactions médicamenteuses contre-indiquant l'utilisation concomitante de certains médicaments ou nécessitant des ajustements de doses en fonction des combinaisons thérapeutiques employées et des variations inter et intra individuelles. Le ritonavir (RTV), un des premiers IP mis sur le marché, n'est plus utilisé comme antirétroviral proprement dit mais comme potentialisateur ou « booster », grâce à son important effet inhibiteur du CYP3A. Ainsi, l'utilisation concomitante du RTV ralentit le catabolisme des autres IP, permettant d'augmenter la demi-vie pour certains IP (fosamprénavir, indinavir) ou la concentration maximale pour d'autres (lopinavir, saquinavir) (Kempf et al. 1997). Excepté pour le nelfinavir qui n'est pas potentialisé et plus recommandé, tous les IP actuellement utilisés doivent être administrés en présence du RTV. Des ajustements de concentrations plasmatiques peuvent être réalisés en jouant sur les doses d'IPs ou de RTV selon l'IP utilisé. C'est une des classes thérapeutiques qui offre le plus d'options médicamenteuses avec 7 molécules actives contre le VIH : le saquinavir (SQV), l'indinavir (IDV), l'atazanavir (ATV), le fosamprénavir (fosAPV), le lopinavir (LPV), le tipranavir (TPV) et le darunavir (DRV). Le nelfinavir (NFV), IP de première génération n'est plus utilisé en France depuis 2007 (**Tableau 2**).

d. Inhibiteurs de l'intégrase (INI)

Les INI du VIH-1 ont pour rôle de bloquer l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée et ainsi d'empêcher la réplication virale. Cette intégration est divisée en plusieurs étapes, chacune pouvant être bloquée indépendamment des autres : 1) formation du complexe enzyme-ADN viral, 2) préparation des extrémités 3' de l'ADN viral double brin par l'intégrase, 3) import du complexe de pré intégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule infectée, 4) intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique (transfert de brin) et 5) réparation de l'ADN après intégration. Trois molécules appartenant à la famille des inhibiteurs sélectifs de transfert brins (STI, pour strand transfer inhibitors) ont été développées depuis quelques années : le raltégravir et l'elvitegravir (de première génération) et plus récemment le dolutégravir (deuxième génération).

e. Inhibiteurs d'entrée

L'entrée du VIH dans la cellule est un processus multi-étapes, lequel comprend l'attachement initial du virus dans la cellule hôte, la liaison aux corécepteurs et la fusion des membranes. Chacune de ces étapes est une cible potentielle pour l'intervention thérapeutique.
Deux classes de molécules utilisées en clinique agissent sur l'étape d'entrée du virus dans la cellule : les inhibiteurs de fusion et les inhibiteurs du corécepteur CCR5. Actuellement, les inhibiteurs d'attachement font l'objet de plusieurs études.

- **Inhibiteur de fusion**

L'inhibiteur de fusion actuellement commercialisé est l'enfuvirtide (T20). Il s'agit d'un peptide synthétique de 36 acides aminés qui reproduit une partie de région répétée HR2 (heptad repeat region 2) de la gp41. L'enfuvirtide, en se fixant de façon compétitive au domaine protéique HR1, empêche l'interaction entre HR1 et HR2 et donc le repliement de la gp41 ce qui empêche la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.

- **Inhibiteur du corécepteur CCR5**

L'inhibiteur du corécepteur CCR5 actuellement commercialisé est le maraviroc. L'utilisation de cette molécule nécessite la détermination préalable du tropisme des souches présentes chez un patient donné, les patients infectés par des souches à tropisme X4 ne pouvant bénéficier d'un traitement par maraviroc. Les antagonistes du corécepteur CCR5, en se fixant sur le co-récepteur CCR5empêchent l'entrée du virus dans la cellule-hôte.

- **Les inhibiteurs d'attachement**

Les inhibiteurs d'attachement (IA) représentent une nouvelle classe d'inhibiteurs d'entrée qui se lient à la gp120. Ils inhibent ainsi, sélectivement les interactions entre le virus et son récepteur cellulaire CD4, en empêchant son entrée dans la cellule hôte. Ces inhibiteurs bloquent les changements conformationnels des glycoprotéines d'enveloppes qui sont induits après leurs liaisons aux CD4 (Ho et al. 2006). La firme Bristol Myers Squibb a mis au point un nouvel inhibiteur d'attachement, le BMS-626529 (en cours de développement). Le BMS-626529 est la prodrogue d'un premier inhibiteur d'attachement (BMS-663068). Cette

molécule a montré une activité antirétrovirale contre la majorité des souches de laboratoire de VIH-1 et les isolats cliniques du VIH-1 exceptés le sous type CRF01_AE et le VIH-1 de groupe O et son activité *in vitro* semble indépendante du tropisme viral (R5 et X4) (Li et al. 2013; Soulie et al. 2013). Cependant, des passages *in vitro* du VIH-1 en présence de cet inhibiteur ont montré l'apparition de substitutions dans la gp120 (L116P, A204D, M426L, M434I-V506 et M475I) se trouvant au niveau du site de liaison avec le CD4 et qui confèrent différents niveaux de résistance au BMS-626529.

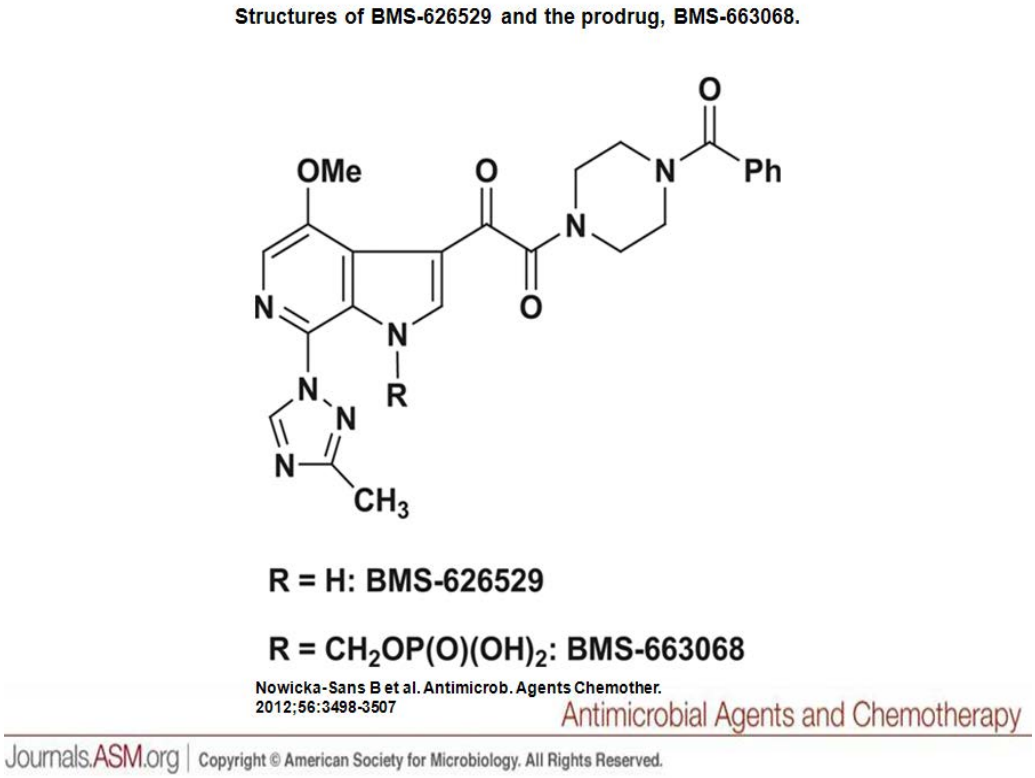


Figure 9. Structure de la molécule BMS-626529 et de la prodrogue BMS-663068.

Tableau 2. Liste des antirétroviraux actuellement disponibles en France.

Dénomination Commune Internationale (DCI)	Abréviation	Nom commercial
Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse		
emtricitabine	FTC	EMTRIVA®
lamivudine	3TC	EPIVIR®
zidovudine	AZT	RETROVIR®
didanosine	ddI	VIDEX®
ténofovir	TDF	VIREAD®
stavudine	d4T	ZERIT®
abacavir	ABC	ZIAGEN®
Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse		
étravirine	ETR	INTELENCE®
éfavirenz	EFV	SUSTIVA®
névirapine	NVP	VIRAMUNE®
rilpivirine	RPV	EDURANT®
Associations d'inhibiteurs de la transcriptase inverse		
lamivudine + zidovudine	3TC + AZT	COMBIVIR®
lamivudine + zidovudine + abacavir	3TC + AZT + ABC	TRIZIVIR®
emtricitabine + ténofovir	FTC + TDF	TRUVADA®
emtricitabine + ténofovir + éfavirenz	FTC + TDF + EFV	ATRIPLA®
abacavir + lamivudine	ABC + 3TC	KIVEXA®
emtricitabine + rilpivirine + ténofovir	FTC + RPV + TDF	EVIPLERA®
Inhibiteurs de la protéase		
tipranavir	TPV	APTIVUS®
indinavir	IDV	CRIXIVAN®
saquinavir	SQV	INVIRAS®
lopinavir	LPV	KALETRA®
darunavir	DRV	PREZISTA®
atazanavir	ATV	REYATAZ®
fosamprénavir	FPV	TELZIR®
ritonavir (booster)	RTV	NORVIR®
Inhibiteurs de l'intégrase		
raltégravir	RAL	ISENTRESS®
elvitégravir	EVG	JTK-303
Dolutegravir	DTG	TIVICAY®
Inhibiteurs du récepteur CCR5		
maraviroc	MVC	CELSENTRI®
Inhibiteur de fusion		
enfuvirtide	T-20	FUSEON®

III-3. Les recommandations pour traiter

Un premier traitement antirétroviral doit permettre de rendre la CV plasmatique <50 copies/mL au plus tard 6 mois après le début de traitement. Afin que le traitement soit efficace et bénéfique pour le patient, il est important de savoir quand et comment le traiter. Les recommandations dans les pays industrialisés qui préconisent de traiter toutes les personnes vivant avec le VIH (Morlat 2013) diffèrent de celles des pays en développement ((OMS) 2013) basées plutôt sur un traitement situationnel. De plus, le choix des molécules antirétrovirales pour commencer le traitement est limité dans les pays à revenus faibles.

a. Quand traiter?

Selon les recommandations du groupe d'experts de 2013 en France, il convient de proposer un traitement antirétroviral efficace à toutes les personnes vivant avec le VIH, y compris précocement après la contamination et /ou lorsque le taux de CD4 reste >500cellules/mm^3(Morlat 2013). Ceci en raison des bénéfices en termes de réduction de la morbi-mortalité et du risque de transmission du VIH. Par ailleurs, dans les pays en développement, l'OMS recommande pour les adultes, une mise en route en priorité :

1) chez toute personne présentant une infection à VIH sévère ou à un stade avancé (stade clinique de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS 3 ou 4) et chez toute personne dont le nombre de CD4 est ≤350 cellules /mm^3,
2) chez toute personne vivant avec le VIH dont le nombre de CD4 est >350 et ≤500 cellules/mm^3, quel que soit le stade clinique de l'OMS ou le nombre de CD4,
3) chez toute personne vivant avec le VIH quel que soit le stade clinique de l'OMS ou le nombre de CD4, dans les situations suivantes : co-infection avec une tuberculose active, co-infection avec le VHB présentant des signes de pathologie hépatique chronique sévère, partenaire séropositif dans un couple sérodiscordant.

b. Comment traiter?

Pour le premier traitement, les recommandations sont équivalentes entre les pays en développement et industrialisés, malgré quelques petites divergences.

De nombreux schémas thérapeutiques sont disponibles dans les pays industrialisés, mais il convient d'utiliser l'association de 2 INTIs et d'un IP/r ou de 2 INTIs et d'un INNTI en

première intention de traiter. Récemment, il peut être recommandé aussi le choix de 2 INTIs et d'un INI (RAL) en première intention de traitement sous certaines conditions (charge virale < $5\log_{10}$copies/mL en Europe).

Dans les pays en développement, la disponibilité des molécules antirétrovirales est limitée, restreignant ainsi le choix des combinaisons thérapeutiques. Ainsi, l'OMS recommande en 2013, un schéma thérapeutique contenant 2 INTIs et un INNTI, l'IP étant réservé pour le traitement de 2ème ligne ou pour les patients ayant des virus du groupe O et les co-infectés VIH-tuberculose. Chez l'enfant, la prise en charge est légèrement différente, prenant en compte la disponibilité des formes pédiatriques, la tolérance aux molécules et l'effet d'une moindre observance chez les enfants. Ainsi, les recommandations françaises et l'OMS préconisent l'association de 2 INTI et d'un IP/r aussi chez les enfants. Dans les pays à ressources limitées, l'IP utilisé est le LPV/r chez les enfants de moins de 3 ans, sinon à défaut la NVP doit être utilisée.

Dans tous les cas, le choix doit se faire parmi un nombre d'associations dont l'efficacité, la tolérance et la simplicité d'emploi ont été bien validées. Il est aussi important de tenir compte des éventuelles interactions médicamenteuses et infections opportunistes concomitantes.

Enfin, il est fortement recommandé de prescrire un test génotypique de résistance lors du diagnostic de l'infection à VIH et de fonder le choix du premier traitement en tenant compte des résultats (cela reste encore indisponible dans les pays en développement).

PAYS INDUSTRIALISES **Rapport Morlat 2013**		**PAYS EN DEVELOPPEMENT** **OMS 2013**	
Adultes	**Enfants**	**Adultes**	**Enfants**
<u>Stratégie INNTI</u> <u>Choix préférentiels</u> FTC/TDF/**EFV** FTC/TDF/**RPV** 3TC/ABC/**EFV** <u>Choix possibles</u> 3TC/ABC/**RPV** FTC/TDF/**NVP** **<u>Stratégie IP</u>** <u>Choix préférentiels</u> FTC/TDF/**ATV/r** FTC/TDF/**DRV/r** ABC/3TC/**ATV/r**Choix possibles FTC/TDF/**LPV/r** ABC/3TC/**LPV/r** ABC/3TC/**DRV/r** **<u>Stratégie IN</u>** FTC/TDF/**RAL** ABC/3TC/**RAL**	ABC+3TC ou AZT+ABC ou AZT+3TC + LPV	**<u>Stratégie INNTI</u>** <u>Choix préférentiels</u> TDF/3TC/**EFV** TDF/FTC/**EFV** <u>Choix possibles</u> AZT/3TC/**EFV** AZT/3TC/**NVP** TDF/3TC/**NVP** ABC/3TC/**EFV** *D4T	3TC/ABC + LPV/r ou NVP 3TC/AZT +LPV/r ou NVP

Tableau3. Différentes stratégies thérapeutiques de 1ère ligne dans les pays en développement et industrialisés, pour les adultes et les enfants.

* Les programmes doivent cesser d‟utiliser le d4T en première intention pour des raisons d‟effets toxiques métaboliques bien connus.

III-4. Echecs thérapeutiques

L'échec thérapeutique regroupe différentes situations :

- l'échec clinique, qui se caractérise par la survenue de manifestations cliniques. Ces manifestations peuvent être des symptômes liés à l'infection par le VIH, une nouvelle infection opportuniste ou la rechute d'une infection préexistante. Dans les pays du Nord, l'échec clinique, conséquence d'une lente faillite des traitements antirétroviraux avec multirésistance, est devenu rare. En revanche, dans les pays du Sud, cet échec est plus important, à cause essentiellement de la rupture de soins.

- l'échec immunologique, qui se définit par l'absence de gain des lymphocytes T CD4+ malgré un traitement efficace depuis au moins 6 mois. Cette situation se rencontre le plus souvent chez les patients ayant initialement un taux de lymphocytes CD4 pré-thérapeutique bas, un âge plus élevé. Cet échec peut s'accompagner d'un échec virologique ou d'un succès (charge virale indétectable).

- l'échec virologique, la situation la plus fréquente, qui se caractérise par une réplication virale persistante malgré le traitement antirétroviral. Il se définit par plusieurs situations : une non-réponse au traitement caractérisée par une baisse de la charge virale plasmatique (CVp) inférieure à 1 log après un mois de traitement, un échec primaire qui correspond à une persistance de la CVp> 50 copies/mL6 mois après le début du traitement, ou un échec secondaire défini par un rebond de la CVp> 50 copies/mL sur 2 prélèvements consécutifs après une période de succès virologique. Lors d'une réplication virale sous traitement, on observe la sélection plus ou moins rapide de variants viraux porteurs de mutations de résistance, capables de se répliquer sous pression antirétrovirale. A ce jour, un seuil à 50 copies/mL est le plus souvent utilisé pour atteindre l'objectif de toute intervention thérapeutique (seuil surtout indiqué dans les pays du Nord, certains pays du Sud restent encore sur un seuil à 200 copies/mL).

En réalité, les mécanismes qui conduisent à l'échec virologique sont évolutifs dans le temps. Chez les patients initiant un traitement, la persistance d'une charge virale détectable après 3 à 6 mois ou le rebond après une période d'indétectabilité sont plutôt liés à une observance médiocre du traitement. A l'opposé, chez les patients multitraités, pour lesquels la succession

de traitements n'a pas été ou très partiellement efficace, la résistance cumulée au cours du temps sous traitement constitue la cause essentielle de l'échec virologique (Kantor et al. 2004; Gazzola et al. 2009). Cependant, le contexte viro-immunologique peut être très différent : CD4 bas et charge virale élevée, mais aussi souvent des patients avec une charge virale relativement modérée (<10000 copies /mL) et un nombre de CD4 satisfaisant contrastant avec multirésistance sur le génotype.

Dans tous les cas, après la mise en évidence d'un échec virologique, il convient de réaliser un test génotypique qui permet de rechercher les mutations de résistance présentes dans les gènes ciblés par les molécules antirétrovirales.

IV. RESISTANCE AUX ANTIRETROVIRAUX

IV-1. Origine de la résistance aux antirétroviraux

La résistance virale peut être définie comme la capacité du virus à se multiplier en présence d'une molécule antivirale à des concentrations qui inhibent la réplication d'un virus sensible. Elle résulte d'un compromis entre l'effet positif des mutations en présence de l'inhibiteur et l'effet négatif de ces mutations sur la fonction de l'enzyme ou de la cible antivirale. La sélection des mutations concerne les gènes codant les protéines cibles des antirétroviraux, la TI, la PR, la gp41, ou l'IN. Les protéines ainsi modifiées deviennent insensibles aux antirétroviraux concernés. L'apparition des mutations est liée aux erreurs introduites au hasard par la TI, avec en moyenne, l'introduction d'une mutation par virion produit et à la recombinaison. Ces variants résistants émergent alors sous pression de sélection.

D'un point de vue fonctionnel, les mutations introduites peuvent être de plusieurs types. Elles sont neutres lorsqu'elles n'agissent pas sur la capacité réplicative du virus et délétères si elles conduisent à une interruption de la séquence virale ou à une modification de la séquence des protéines ne permettant plus au virus de se répliquer normalement. Enfin, ces mutations peuvent conférer un avantage sélectif au virus en diminuant la sensibilité du virus aux antirétroviraux sans en empêcher sa multiplication, ce sont les mutations de résistance. Le haut degré de recombinaison du VIH-1 augmente encore la capacité d'émergence de variants porteurs de mutations de résistance. Ces phénomènes peuvent aboutir à un échec de traitement et peuvent être à l'origine de variants multi-résistants (Weber et al. 2003).Ainsi, l'antiviral n'est pas directement responsable des mutations mais exerce une sélection sur les populations de mutants préexistants. La multithérapie, permettant d'agir simultanément sur plusieurs

cibles, diminue la probabilité de sélectionner une population virale portant d'emblée les mutations conférant une résistance aux différentes molécules utilisées dans une combinaison. Cependant une même mutation peut conférer une résistance plus ou moins forte à plusieurs molécules d'une même classe : c'est la résistance croisée. D'où, l'importance de combiner les molécules de classes thérapeutiques distinctes, le plus souvent 2 INTIs + 1 IP ou 2 INTIs + 1 INNTI. Il est établi que même sous trithérapie efficace avec une charge virale plasmatique sous le seuil de détectabilité, une réplication résiduelle plus ou moins importante continue de se produire (Moutouh et al. 1996). L'une des raisons expliquant ce phénomène est que toutes les molécules ne peuvent pas pénétrer tous les compartiments de l'organisme à des concentrations efficaces (Sigal et al. 2011). Ces compartiments, « sanctuaires » pour le virus, peuvent représenter l'antichambre de la résistance où les concentrations suboptimales permettent la sélection plus ou moins rapide de variants qui accumuleront graduellement les mutations de résistance. Ces résistances conduiront à des souches de plus en plus aptes à se répliquer en présence des molécules, jusqu'à l'obtention d'un profil génotypique de résistance suffisamment important pour atteindre un niveau de réplication conséquent et donc une charge virale plasmatique détectable et définir ainsi l'échec thérapeutique. La rapidité de ce processus dépendra de la puissance des molécules utilisées, de leur pouvoir de diffusion, mais aussi de l'observance du patient et des interactions médicamenteuses. Enfin, la résistance aux médicaments peut soit être acquise à travers une pression de sélection (résistance acquise), soit transmise de personne à personne (résistance transmise ou résistance primaire).

IV-2. Mécanismes de la résistance aux antirétroviraux

a. Résistance aux INTIs

Deux principaux mécanismes moléculaires distincts ont été identifiés comme étant à l'origine de la résistance aux analogues nucléosidiques : l'excision de l'analogue de la chaîne d'ADN en formation et la diminution de l'incorporation de l'analogue lors de la synthèse de l'ADN (Shehu-Xhilaga et al. 2005).

Le premier mécanisme concerne les mutations de résistance sélectionnées par les analogues de la thymidine que sont l'AZT et le d4T et qui sont appelées TAMs (thymidine analogue mutations). Il est associé à un renforcement de l'enlèvement des analogues au niveau de ses sites d'attachement entrainant la reprise d'élongation de la chaîne d'ADN. En effet, leur

présence sur le gène de la TI augmente la capacité de cette enzyme à exciser l'analogue terminateur de chaîne (la molécule antirétrovirale) venant d'être incorporé à l'ADN proviral en cours d'élongation : c'est la réaction de phosphorolyse. Cela consiste à détacher l'analogue déjà incorporé par son phosphate en rattachant celui-ci à un accepteur externe (Meyer et al. 1998). Deux substrats sont susceptibles d'accepter ce phosphate : le pyrophosphate (PPi) produit lors de la synthèse d'ADN (voix minoritaire dite pyrophosphorolyse), et beaucoup plus fréquemment l'ATP (la phosphorolyse proprement dite). Les TAMs favorisent ces réactions. Elles sont huit et concernent six positions sur le gène de la TI : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Certaines études ont suggéré qu'elles pouvaient être séparées en deux profils distincts dits TAMs-1 et TAMs-2. La voie dite TAMs-1 comprend les mutations M41L, L210W, T215Y et occasionnellement la D67N alors que la voie dite TAMs-2 comprend la D67N, la K70R, la T215F et la 219E/Q (Marcelin et al. 2004). Les mutations en position 67 et 70, situées au niveau des doigts sur la TI améliorent la flexibilité de l'enzyme, tandis que la mutation en position 215 située dans la paume favorise la fixation de l'ATP(Arion et al. 1998; Meyer et al. 1999). Ces changements facilitent ainsi la réaction de phosphorolyse. Bien que ces mutations ne soient sélectionnées que par l'AZT et le d4T, elles auront tout de même un impact sur l'efficacité des autres molécules de la classe : c'est la résistance croisée.

Le deuxième mécanisme consiste à accroître la capacité de TI à discriminer les analogues terminateurs de chaîne. La TI incorpore alors beaucoup moins les terminateurs sans trop diminuer son affinité pour les analogues naturels. C'est la résistance par discrimination ou par perte d'affinité (Boyer et al. 2001). La mutation M184V confère *in vitro* un haut niveau de résistance au 3TC par ce mécanisme. L'incorporation du 3TC dans l'enzyme mutée est diminuée de 20 à 100 fois par rapport à son incorporation dans une enzyme sauvage. Cette diminution de l'incorporation est le résultat d'un encombrement stérique entre l'enzyme portant la M184V et le 3TC-TP. En effet, la chaîne latérale de la valine en position 184 empêche un positionnement correct du 3TC-TP pour la catalyse. Le mécanisme par perte d'affinité est également décrit pour d'autres mutations telles que K65R, L74V, Q151M et son complexe (A62V, V75I, F77L, F116Y). Elles sont situées dans le site de liaison des dNTP ou proches de celui-ci. La plupart de ces mutations diminue aussi plus ou moins la capacité réplicative des virus car l'incorporation des nucléosides naturels est également touchée. Les molécules sélectionnant ces mutations sont : la didanosine (ddI) ; la lamivudine/emtricitabine (3TC/FTC) ; l'abacavir (ABC) et le tenofovir (TDF).

La didanosine (ddI) : en monothérapie elle sélectionne la L74V et plus rarement la K65R. Les virus portant un grand nombre de TAMs ont également montré un certain degré de résistance à la ddI (Whitcomb et al. 2003). Cependant, la résistance induite par les TAMs semble faible puisque des expériences réalisés *in vitro* montrent que l'excision de la ddI induite par les TAMs est minime, inférieure à celle induite pour les autres INTI (Flandre et al. 2007).

La 3TC et FTC : Ce sont les mutations M184I et M184V qui sont sélectionnées sous 3TC/FTC lorsque la charge virale dépasse les 200 copies/mL (Naeger et al. 2002). La mutation M184I apparaît la première et est remplacée par la M184V qui confère au virus une meilleure capacité réplicative que la M184I. Au cours d'un échec thérapeutique, l'absence de la M184I/V sur le génotype de résistance peut faire soupçonner une mauvaise observance du traitement. *In vitro*, la M184I/V conférerait aussi une certaine résistance à la ddI alors que des résultats cliniques supposent au contraire une resensibilisation (Eron et al. 1995). *In vivo*, la M184V/I n'a d'impact sur l'abacavir que lorsqu'elle est associée à d'autres mutations. Sa présence sur le gène de la TI retarde l'émergence des TAMs (Mouroux et al. 2001; Marcelin et al. 2005).Elle aurait un impact important sur la capacité réplicative du virus d'où une disparition rapide de la mutation lorsque que la molécule n'est plus dans le traitement (Diallo et al. 2003). L'équipe de Castagna montre que le maintien du 3TC seul, en présence de la M184V, favoriserait le maintien d'une charge virale plus basse qu'en l'absence de tout traitement (Castagna et al. 2006). Ces résultats s'expliqueraient par un effet fitness de la M184V ou une activité antivirale résiduelle de la 3TC. Une autre équipe a montré que dans le contexte d'un traitement inefficace le retrait de la 3TC aurait tendance à faire augmenter la charge virale malgré la présence de la M184V (Campbell et al. 2005). Ainsi l'utilisation du 3TC/FTC en présence de la M184V pourrait contribuer à contenir la réplication virale dans le cas où plus aucun traitement totalement efficace n'est envisageable. Enfin, une étude récente montre qu'en cas de traitement optimisé comprenant plusieurs molécules actives, le retrait du 3TC chez les patients infectés par un virus portant la M184V devrait être envisagé car il ne modifie pas l'efficacité du traitement antirétroviral (Trottier B MN 2011).

L'abacavir (ABC) : Cette molécule sélectionne surtout la L74V mais aussi la K65R, Y115F et la M184V (Miller et al. 2000). *In vitro*, la combinaison L74V+M184V augmenterait la susceptibilité aux analogues de la thymidine (AZT et d4T) et diminuerait l'efficacité des autres INTI.

Le Tenofovir (TDF): la K65R est la mutation préférentiellement sélectionnée par cette molécule. Cette mutation impacte aussi l'activité de la 3TC, ABC et ddI. Sa prévalence reste

faible en pratique clinique probablement à cause de l'effet négatif de cette mutation sur la réplication virale. Sa présence sur le gène de la TI semble également incompatible avec les TAMs et la L74V. La mutation K70E a également été très récemment associée au TDF mais elle est très rare en pratique clinique.

A côté de ces deux mécanismes majeurs, il existe un mécanisme mixte de résistance pour la mutation K65R et certains mécanismes d'interaction entre mutations pouvant être associés à une resensibilisation du VIH à certaines molécules (Masquelier et al. 2004). Par exemple, les mutations M184V/I retarderaient l'apparition des TAMs et augmenteraient la sensibilité *in vitro* à l'AZT et d4T. Aussi, la présence de la mutation Y181C dans un contexte de résistance à l'AZT resensibiliserait le virus résistant à l'AZT (Shafer 2002).
Les insertions 69, ajoutant 1 à 11 (le plus souvent 2) acides aminés dans une boucle flexible β-3-β-4 du sous domaine de la TI entraînent une résistance à l'ensemble des INTI. L'insertion 69 est, souvent retrouvées en présence de TAMs.

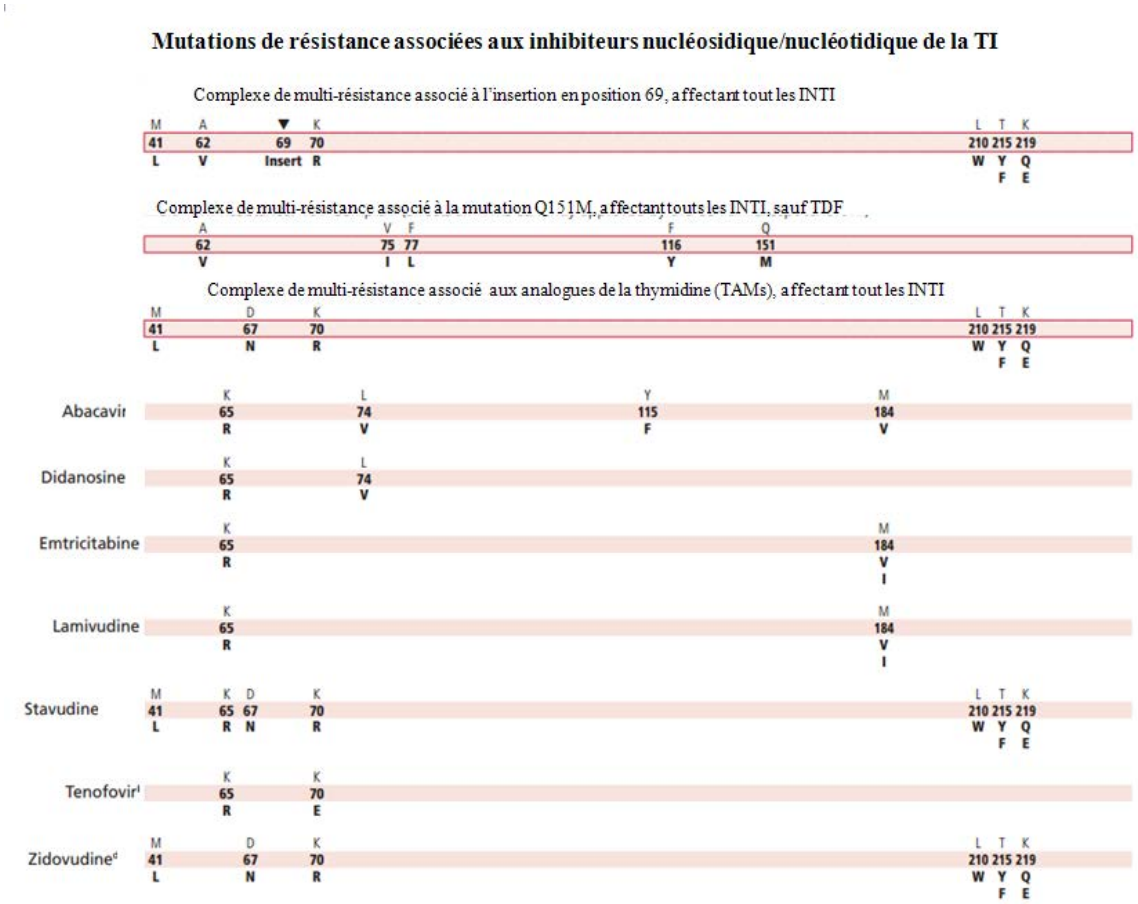


Tableau 4 : Liste des mutations associées à la résistance aux inhibiteurs nucléotidiques/nucléotiques de la TI selon la liste IAS-USA 2013.

b. **Résistance aux INNTIs**

La barrière génétique de la résistance aux INNTIs de première génération est faible ce qui signifie que les mutations de résistance sont acquises rapidement dès que la charge virale est détectable.

La résistance aux INNTIs est due à la sélection de mutations ponctuelles situées sur les bords de leur site de fixation qui est une poche hydrophobe de la TI. Ces mutations sont situées dans deux régions distinctes (entre les codons 100 – 108 et 179 – 190). Certaines mutations sont communes aux deux INNTIs de première génération (névirapine et éfavirenz) à quelques exceptions près et de deuxième génération (étravirine et rilpivirine). Les mutations diminuent fortement la fixation des INNTIs à la TI et entraînent une résistance croisée de très haut niveau avec une augmentation de plus de 100 fois de la concentration inhibitrice 50% (CI50) aux INNTIs de 1ère génération (l'éfavirenz et la névirapine).Par exemple, la présence des mutations Y181C et Y188C diminue fortement la fixation des INNTIs en modifiant la taille et la forme de la poche de liaison (Joly et al. 2004).

Les données disponibles suggèrent que des mutations ponctuelles comme la 103N sélectionnées ont des effets limités sur la capacité virale mais confèrent des hauts niveaux de résistance et perdurent en l'absence de pression de la molécule (Joly et al. 2004). La faible barrière génétique de ces molécules conduit à une sélection rapide de ces mutations très probablement déjà présentes dans la population virale avant tout traitement. Toutes ces données montrent l'inutilité de conserver cette classe en présence de mutations ou en l'absence de traitement suffisamment puissant pour maintenir la charge virale indétectable.

L'étravirine et plus récemment la rilpivirine sont les deux molécules de deuxième génération commercialisées. Ces deux molécules sont proches au niveau structural et partagent une moindre résistance croisée avec les composés de première génération. Alors que l'étravirine semble posséder une barrière génétique élevée, la rilpivirine sélectionnerait rapidement des mutations de résistance. Des études récentes de phase III chez des patients naïfs d'antirétroviraux (ECHO et THRIVE) ont comparé l'efficacité virologique d'une trithérapie comprenant 2 INTIs/éfavirenz à une nouvelle trithérapie 2 INTIs/rilpivirine (Cohen et al. 2011; Molina et al. 2011). Ces études montrent un pourcentage plus élevé d'échecs virologiques dans le bras rilpivirine (en association avec emtricitabine et ténofovir) par rapport au bras éfavirenz (10 % versus 6 %). Dans ces études, la mutation E138K sélectionnée sous rilpivirine est fréquemment retrouvée avec la mutation M184I en cas d'échec virologique. Cette association a posé la question d'une interaction entre la mutation E138K à

la rilpivirine et la mutation M184I à l'emtricitabine. Ainsi, des expériences de mesure de l'activité de la TI *in vitro* ont montré que le mutant E138K/M184I possèderait une meilleure activité TI par rapport au mutant E138K/M184V.D'autres études suggèrent que le mutant E138K/M184I développerait une résistance phénotypique plus élevée à la rilpivirine que le mutant E138K/M184V (Kulkarni et al. 2012).

Il est donc recommandé de ne pas laisser persister de réplication résiduelle sous éfavirenz ou névirapine, ce qui entrainerait rapidement l'accumulation de mutations de résistance aux INNTIs et réduirait les possibilités de traitement ultérieur par les molécules de seconde génération comme l'étravirine et la rilpivirine.

Mutations de résistance associées aux inhibiteurs non nucléosidique de la TI

| | | |

des IP, on distingue deux types de mutations pouvant émerger : des mutations dites majeures et des mutations dites mineures. Les mutations majeures comme les mutations D30N, G48V, I50L/V, V82A/F/L/S/T et I84V (Johnson et al. 2008), sont les premières à être sélectionnées et sont situées au niveau du site actif de l'enzyme. Une mutation majeure va changer la conformation du site actif de la protéase empêchant ainsi l'IP de s'y fixer (Mahalingam et al. 1999). Elles ont en général un effet délétère sur la capacité de réplication du virus résistant (Nijhuis et al. 2001) Les mutations mineures surviennent secondairement et sont situées à l'extérieur du site actif. Ces mutations à elles seules ne sont pas responsables de la résistance mais, associées aux mutations majeures, augmentent le niveau de résistance et permettent de compenser partiellement la capacité réplicative du virus. Alors que les mutations primaires sont assez spécifiques d'un inhibiteur donné, les mutations secondaires sont communes aux différents IP.

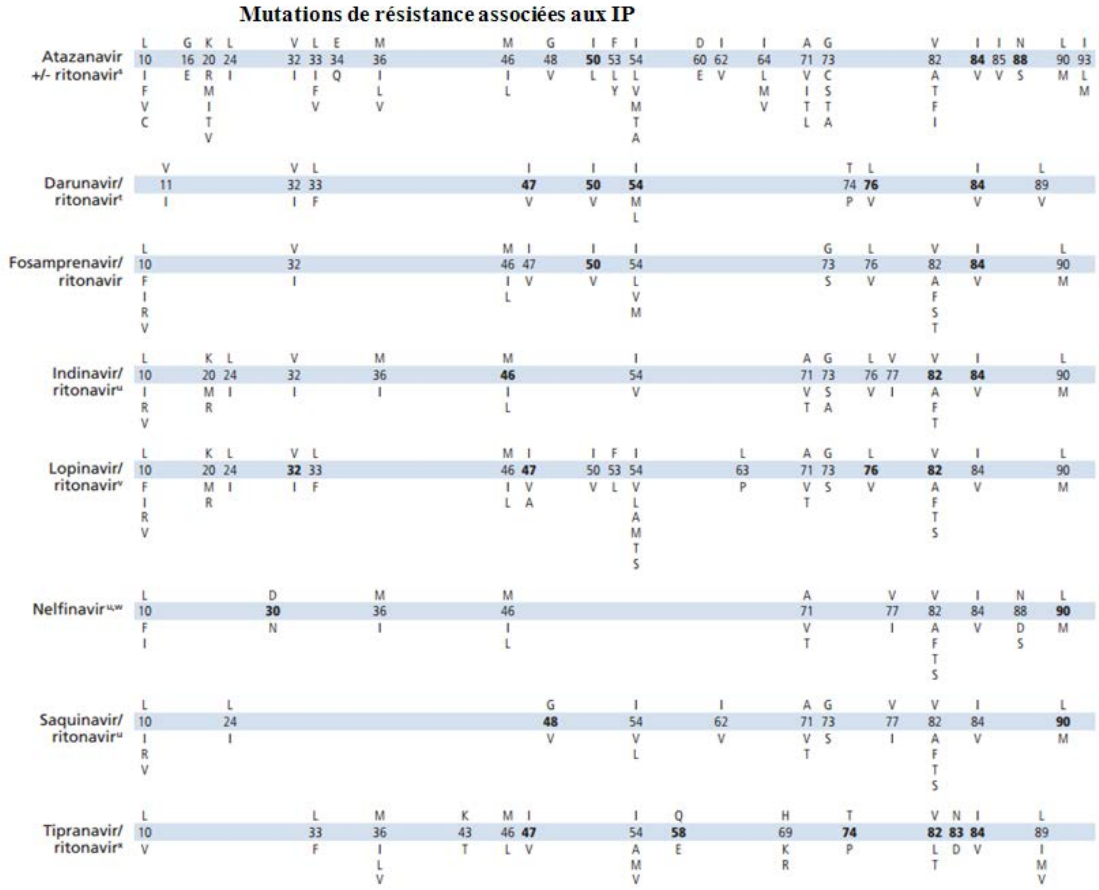


Tableau 6. Liste des mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de la protéase selon la liste IAS-USA 2013.

d. **Résistance aux INI**

Deux profils majoritaires distincts comportant soit la mutation N155H soit la mutation Q148K/R/H associés à une ou plusieurs mutations secondaires sont décrits pour le raltégravir (Delelis et al. 2009). D'autres profils moins fréquents peuvent également être associés à la résistance(Reigadas et al. 2010).Le profil Q148 semble plus fréquent et entraîne un très haut niveau de résistance. Le profil N155 est moins fréquent et entraîne également un haut niveau de résistance avec une altération de la capacité réplicative du virus. L'addition de mutations secondaires aux mutations primaires restaure en partie l'infectivité. En ce qui concerne l'elvitegravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment E92Q ou N155H. Il existe une résistance croisée très importante entre le raltégravir et l'elvitégravir. La barrière génétique de cette famille est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules. Il convient donc d'être très vigilant et de n'autoriser aucune réplication résiduelle sous traitement comportant un inhibiteur d'intégrase de première génération. Un nouvel inhibiteur d'intégrase, le dolutégravir (DTG, GSK-1349572) vient d'être mis récemment sur le marché. Les résultats préliminaires de l'étude VIKING (évaluant ce nouvel inhibiteur) obtenus chez des patients prétraités en échec avec une résistance génotypique à au moins deux classes d'antirétroviraux et au raltégravir ont montré une efficacité après 11 jours de traitement. L'efficacité antivirale est cependant réduite chez les patients porteurs d'un virus avec le profil Q148, comparé aux virus avec le profil N155H ou Y143C. Les résultats à 24 semaines de cette étude ont montré une très bonne efficacité du dolutégravir chez les patients infectés par un virus résistant au raltégravir et/ou Elvitegravir (Castagna et al. 2014).

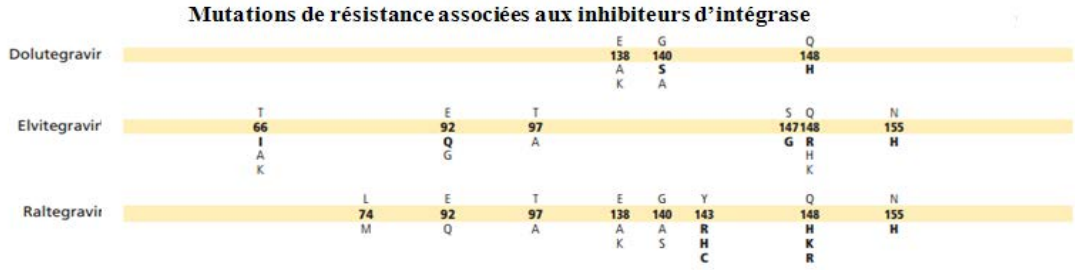


Tableau 7 : Liste des mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de la INI selon la liste IAS-USA 2013.

e. Résistance aux inhibiteurs de fusion

Les mutations de résistance au T20 ont été mises en évidence dans la région HR2 de la gp41, région de liaison au T20. Les premières études *in vitro* ont mis en évidence des mutations au niveau des trois codons 36, 37 et 38 puis des études cliniques chez des patients en échec sous T20 ont mis en évidence d'autres mutations de résistance dans cette même région entre les acides aminés 36 et 45 (Poveda et al. 2004).

Mutations de résistance associées aux inhibiteurs d'entrée

	G	I	V	Q	Q	N	N
Enfuvirtide	36	37	38	39	40	42	43
	D	V	A	R	H	T	D
	S		M				
			E				

Tableau 8. Liste des mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'entrée selon la liste IAS-USA 2013.

f. Résistance aux antagonistes du CCR5

Les premières données concernant la résistance aux antagonistes du CCR5 montrent que le VIH-1 peut développer des résistances par sélection de mutations entraînant des changements phénotypiques et génotypiques (mutations dans la boucle V3 de la gp 120), sans changement de tropisme du virus qui continue à utiliser le co-récepteur CCR5 (Baba et al. 2007).Il a aussi été montré que des populations de virus à tropisme CXCR4, minoritaires et non détectées à l'instauration du traitement, pouvaient émerger au cours du traitement (Moncunill et al. 2008). Le changement de tropisme peut aussi être une voie d'échappement au traitement sans mutations de résistance dans la gp120.

IV-3. Barriere génétique à la résistance

Dans le développement de la résistance, l'antiviral n'est pas directement responsable des mutations mais il exerce une sélection sur les populations de mutants préexistants pouvant entrainer la résistance. La barrière génétique est la capacité à sélectionner des virus résistants lorsque la réplication virale n'est pas contrôlée. La barrière génétique constitue un facteur important dans le développement de cette résistance et peut être très différente selon les antirétroviraux. En réalité, la notion de barrière génétique comprend plusieurs concepts combinant : le nombre de changement nucléotidique nécessaire pour obtenir une mutation de résistance, l'impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'antirétroviral, l'impact de

cette mutation sur la capacité réplicative virale, l'ensemble conditionnant la vitesse de sélection des variants résistants (Delaugerre 2010).

Aussi le type et le nombre de changement de nucléotide peuvent influencer la sélection de mutations. Une transition de nucléotide (une substitution de A vers G ou de C vers T c'est-à-dire une base purine vers une autre base purine ou une base pyrimidine vers une autre base pyrimidine) est un évènement 2,5 fois plus fréquent qu'une transversion de nucléotide (changement de A vers C ou T, de G vers C ou T ; c'est-à-dire une base purine vers une base pyrimidine et vice versa). A titre d'exemple, à la position 181 pour que la tyrosine (Y) devienne une cystéine (C), il faut un changement nucléotidique de type transition TAT-TGT. Par contre, à la position 103 pour que la lysine (K) devienne une Asparagine (N), il faut une transversion AAA-AAC. Cependant certaines mutations nécessitent le changement successif de 2 nucléotides comme pour la mutation T215Y qui est due aux changements des deux premières bases ACC vers TAC, ce qui correspond à deux transversions. Il peut également s'agir de deux types de changements concomitants : c'est le cas de la mutation T215F ACC-TTC (transversion-transition) ou celle T69N ACT-GAT (transition-transversion). Ainsi toutes les mutations ne sont pas sélectionnées de la même façon, ni à la même fréquence.

La grande variabilité entre les sous types au niveau nucléotidique peut aussi avoir un impact significatif sur la barrière génétique pour la résistance. L'impact de cette variabilité génétique inter-sous-type est bien illustré par la mutation V106M qui est sélectionnée sous traitement par éfavirenz. Bien que le traitement à l'éfavirenz soit répandu chez les patients infectés par le sous-type B, cette mutation, n'avait jamais été décrite jusqu'à ce que des études soient effectuées sur le sous type C (Brenner et al. 2006). La propension accrue du sous type C à acquérir la mutation V106M est due à un autre codon valine (GTG) en position 106 de la TI par rapport au sous type B (GTA). La barrière génétique est plus faible pour le sous-type C, car le nombre de mutations nécessaires pour acquérir V106M est de 2 transitions pour le sous-type B (GTA à ATG) alors qu'il n'est que de 1 transition pour le sous-type C (GTG à ATG).

Les variations génétiques de la cible d'un traitement peuvent impacter la sensibilité de ce traitement, ainsi pour un ARV donné, la barrière génétique est faible lorsqu'une seule mutation du génome viral suffit à conférer un haut niveau de résistance phénotypique à cette molécule. Exemple : la M184V pour la 3TC ou K103N et Y181C pour les INNTIs de première génération. Au contraire, pour un ARV ayant une barrière génétique élevée il faudra plusieurs mutations successives pour conférer un haut niveau de résistance. C'est le cas de la résistance aux IP/r et de la zidovudine (INTI), qui nécessitent plusieurs mutations au niveau des gènes cibles, sous réserve d'une concentration suffisante dans le sang.

Le traitement ARV étant une combinaison de trois ou plusieurs molécules hautement actives, il est important de prendre en compte la barrière thérapeutique globale de la combinaison plutôt que la barrière génétique de chaque molécule pris séparément. Cela permet de protéger cette combinaison en ce qui concerne la sélection rapide des mutations de résistance.

En effet, la barrière génétique d'un produit peut dépendre fortement des différents produits qui lui sont associés. Des études ont montré la supériorité de certaines stratégies thérapeutiques en ce concerne l'émergence de mutations de résistance. Ainsi, dans une étude réalisé dans les pays à ressources limitées, Clumeck et collaborateurs ont présenté les résultats de la cohorte de Lubumbashi dans laquelle une première ligne de traitement composée avec du LPV\r est comparée à une première ligne comprenant la NVP. Les résultats étaient comparables entre les deux bras. Toutefois, les échecs virologiques étaient significativement plus fréquents dans le bras INNTI (17%) que dans le bras IP (8%) avec un p= 0.019. Les mutations de résistance associées aux INNTI étaient détectées chez 86% et 68% de résistance associée aux 2 classes (INNTI et INTI) chez les patients en échec dans le bras NVP. Aucune mutation majeure n'a été détectée dans le bras IP après l'échec. Ce ratio particulièrement favorable au bras IP était dû à une plus forte barrière génétique des IP boostés. Cependant ce résultat devra être évalué au regard du coût efficacité sur le long terme des traitements surtout dans un contexte particulier du Sud (Clumeck et al. 2014).

Actuellement de nombreuses études montrent l'intérêt de l'usage des inhibiteurs d'intégrase dans des stratégies thérapeutiques dans les pays du Nord. En effet, plusieurs études ont montré la non infériorité de ces différentes stratégies comparées aux combinaisons recommandées pour l'initiation des patients naïfs aux traitements ARV. Les auteurs expliquent ces résultats en partie par l'absence de développement rapide d'une résistance dans les bras des individus naïfs traités par l'inhibiteur d'intégrase, comme le DTG associé à la NVP et au 3TC (Oliveira et al. 2014).Une méta analyse a aussi démontré la supériorité des inhibiteurs d'intégrase aux autres régimes thérapeutiques (Messiaen et al, 2013). Toutefois, une utilisation judicieuse s'impose lors du remplacement d'un médicament de haute barrière génétique chez les patients prétraités avec un succès virologique.

IV-4. Conséquences de la diversité génétique des sous-types non B sur la résistance

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de réplication du virus, couplé à une faible fidélité de la TI et au phénomène de recombinaison génétique. Elle joue un rôle central

dans la pandémie du VIH-1 et a d'importantes implications pour la pathogenèse, la transmission, la gestion clinique, la réponse immune et le développement d'un vaccin anti-VIH. La grande majorité des infections à travers le monde est due aux sous-types non B. Il est donc important d'étudier les éventuelles conséquences que peut avoir cette diversité sur la résistance aux traitements.

La variabilité génétique du VIH-1 implique les gènes codant les enzymes virales, cibles des molécules thérapeutiques. Il a été rapporté que, la plupart des mutations de résistance connues dans le sous-type B est retrouvée dans les sous-types non B (Kantor et al. 2005). Cependant, certaines substitutions en acides aminés sont retrouvées à des fréquences élevées au niveau des positions impliquées dans la résistance aux ARVs pour certains sous-types non-B. Par exemple, la mutation V106M associée aux INNTI est retrouvée dans les sous-types C et CRF01_AE, alors qu'elle est rarement observée dans le sous-type B lors d'un échec aux INNTIs (Martinez-Cajas et al. 2009). Aussi, des travaux du Pr Wainberg ont mis en évidence la sélection plus rapide dans le sous-type C de la mutation de résistance au ténofovir K65R par rapport au sous-type B; en effet, pour une même concentration de ténofovir, le sous-type C développe la mutation de résistance K65R en 12 semaines alors qu'elle n'apparaît pas au bout de 74 semaines pour le sous-type B(Martinez-Cajas et al. 2009).Ceci s'explique par le fait que le sous-type C possède un polymorphisme particulier au niveau du triplet 65 (Molina et al.), nécessitant le changement d'un nucléotide pour conduire à la résistance (Castagna et al.), alors que le sous-type B a besoin de deux changements pour obtenir le codon muté (AAA – AGG). L'équipe japonaise d'Ariyoshi a également montré l'existence d'un panel de mutations chez des patients infectés par le recombinant CRF01_AE, différent de celui observé dans le sous-type B après un traitement ARV contenant des INTI (AZT, 3TC ou ddI) et des IP (NFV, IDV ou SQV) (Ariyoshi et al. 2003).

Afin d'évaluer l'impact de ce polymorphisme sur la résistance aux ARVs, de nombreuses études phénotypiques ont été menées sur le gène de la protéase, gène portant de nombreuses mutations mineures de résistance chez les sous-types non-B. Même si beaucoup de résultats concluent que les patients infectés par des VIH-1 de sous-type non-B répondent aussi bien aux traitements ARV que les patients infectés par du sous-type B, certaines études montrent une sensibilité réduite de certains sous-types aux IP. Par exemple, la mutation L89V associée aux IP se produit dans les sous-types C, F et G et non dans le sous type B (Martinez-Cajas et al. 2009). Aussi, plus de 50% des virus de sous-types non-B infectant des patients naïfs portent au moins trois mutations de résistance aux IP, alors que cela ne concerne que 8% des virus de sous-type B(Holguin and Soriano 2002). L'équipe de Perno et al a démontré que la

mutation mineure M36I du gène de la PR, polymorphique dans les sous-types non-B, était prédictive d'un échec virologique après 24 semaines de traitement antirétroviral contenant un IP; en effet, l'apparition de la mutation majeure L90M lors d'un échec virologique était associée à la présence de la mutation M36I (Perno et al. 2004).

Les profils d'échappement peuvent être également différents selon le sous-type de VIH-1; en effet, certaines mutations spécifiques aux sous-types peuvent être sélectionnées lors de traitements. Par exemple, le sous-type C, impliqué dans près de 50% des infections dans le monde, semble sélectionner plus rapidement la mutation K65R (Brenner et al. 2006). Ainsi, la différence des profils d'échappement entre les sous-types B et non-B peut avoir un impact sur le choix des stratégies thérapeutiques.

Les réponses clinique, immunologique et virologique aux traitements antirétroviraux chez les patients infectés par des sous-types non-B ont été évaluées dans plusieurs études, à différents stades de l'infection. De manière générale, la réponse aux traitements est similaire entre les 2 groupes, malgré un taux de lymphocytes T CD4+ plus bas chez les non-B à l'initiation du traitement (De Wit et al. 2004). La majorité des études compare la réponse aux traitements des patients infectés par des virus B versus non-B, sans distinction au sein des sous-types recombinants infectant les patients, alors qu'il est essentiel à l'heure actuelle de pouvoir connaître la sensibilité de chaque sous-type au traitement pour une meilleure prise en charge ultérieure. Une étude a montré une disparité de la réponse virologique au sein de certains sous-types, les sous-types A et D ayant un taux de suppression de la CVp plus faible après 6 mois de traitement que les sous-types B et CRF01_AE (Atlas et al. 2005). Ces données montrent l'importance de mener des études comparant la réponse au traitement entre les sous-types non-B.

V. EVALUATION DE LA RESISTANCE

V-1. Les tests génotypiques

Ces tests consistent à rechercher par séquençage, dans le gène correspondant à la cible de l'antirétroviral, des mutations connues comme associées à la résistance. La technique de référence utilisée est le séquençage direct des gènes des protéines cibles des antirétroviraux afin de déterminer si les codons sont de type sauvage ou muté par rapport à une séquence de référence. Les avantages de cette technique sont sa rapidité d'exécution, sa reproductibilité et

sa standardisation (évalués par des contrôles de qualité nationaux et internationaux). L'ARN viral plasmatique extrait est d'abord rétrotranscrit en ADN puis les gènes de la TI et de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3 ou de la gp41 sont amplifiés spécifiquement par PCR. La sensibilité correspond à une limite inférieure de détection qui varie actuellement entre 20 et 50 copies/mL de charge virale plasmatique dans le prélèvement initial. Les gènes sont alors séquencés directement à partir du produit de PCR au moyen de séquenceurs automatiques. Les séquences ainsi obtenues sont comparées à une séquence de référence, dite « sauvage », dénuée de mutations de résistance. La méthode consiste alors à identifier les substitutions ou insertions d'acides aminés impliquées dans la résistance aux antirétroviraux et l'interprétation s'appuie sur des règles ou algorithmes d'interprétation empiriques. La construction d'algorithmes d'interprétation, mis à jour régulièrement, permet de traduire le profil de mutation observé en « sensible », « résistance possible » ou « résistance » pour chaque molécule. On peut également établir le nombre de molécules encore actives dans une combinaison thérapeutique : c'est le GSS « genotypic sensitivity score » ou score de sensibilité génotypique.

Les mutations sont définies par rapport à une séquence VIH-1 consensus de sous-type B, majoritaire en France, aux USA et dans les pays occidentaux mais qui est rare en Afrique. De plus, cette technique standard de détermination du génotype ne permet d'analyser que la population majoritaire lorsqu'elle représente au moins 15 à 20% de la population virale totale circulante dans le plasma. Des approches différentes pour détecter des variants minoritaires (entre 1 et 15%), comme le clonage moléculaire ou le pyroséquençage sont actuellement réservées aux protocoles de recherche.

V-2. Les tests phénotypiques

Ces tests consistent à évaluer le comportement du virus en culture cellulaire en présence d'un antirétroviral et de le comparer à une souche sauvage de référence. Le mode d'expression est la concentration inhibitrice 50 ou 90% (CI_{50} ou CI_{90}), concentration d'antirétroviral réduisant la production du virus en culture cellulaire respectivement de 50% ou 90%. Le test phénotypique de référence utilise le virus isolé à partir de lymphocytes de sang périphérique (test de référence de l'AC11- ANRS). Il existe également le test RVA (pour « *recombinant virus assay* ») (Hertogs et al. 1998): un virus VIH-1 artificiel est produit par l'insertion de la région du gène *pol* du virus du patient dans le génome d'un virus adapté à la croissance sur

lignée cellulaire. Ce virus recombinant est cultivé en présence d'une concentration croissante d'antirétroviraux et le taux de réplication *in vitro* est mesuré. En utilisant ces techniques, le phénotypage a l'avantage de fournir des résultats quantitatifs (CI_{50}) et permet de prendre en compte toutes les mutations présentes *in vivo* sur les gènes étudiés. Cependant cette méthode est longue, complexe et coûteuse. Pour ces raisons, ces tests sont surtout utilisés dans le cadre d'essais thérapeutiques, pour l'étude de nouveaux antirétroviraux en particulier.

V-3. UTILISATION DES TESTS DE RESISTANCE

Lors d'un échec thérapeutique, l'utilité des tests génotypiques de résistance pour prescrire une nouvelle combinaison antirétrovirale a été démontrée, des points de vue virologique et clinique, par plusieurs études (Baxter et al. 2000; Cingolani et al. 2002). Le choix préférentiel des tests génotypiques plutôt que des tests phénotypiques repose d'une part sur la faisabilité des premiers et d'autre part sur les résultats d'essais randomisés qui montraient une utilité des tests génotypiques dans 80% des cas contre seulement 25% des cas pour les tests phénotypiques (Shafer 2002). Les recommandations françaises préconisent l'utilisation des tests génotypiques de résistance dans des situations cliniques précises au cours du suivi des adultes et des enfants infectées par le VIH(Yeni 2010). La principale indication est la prise en charge des échecs thérapeutiques. D'autres situations cliniques nécessitent la réalisation d'un génotype, par exemple lors de la découverte de la séropositivité, avant l'initiation de la première ligne de traitement ou en cas de grossesse. Les tests de résistance doivent toujours être réalisés lorsque le patient est sous traitement, le virus résistant pouvant devenir minoritaire et non détecté par le test, en cas d'interruption thérapeutique.

VI. PROBLEMATIQUES D'ACCES AUX TRAITEMENTS DANS LES PAYS DU SUD

L'accès aux traitements dans les pays du Sud, en particulier en Afrique sub-saharienne pour les personnes infectées par le VIH s'accroit d'année en année. Entre 1995 à 2012, la thérapie antirétrovirale a permis d'éviter 5,5 millions de décès lié au Sida dans les pays à ressources limitées((UNAIDS) 2013). Cependant, Il y a une grande disparité dans ces régions, car les services de dispensation des ARV sont plus ou moins performants dans certaines régions. Ces services sont plus disponibles en Afrique orientale et australe qu'en Afrique de l'Ouest ou du centre. Ainsi, une dizaine de pays (Botswana, Cap-Vert, l'Érythrée, le Kenya, la Namibie, le

Rwanda, l'Afrique du Sud, Swaziland, Zambie et Zimbabwe) ont déclaré avoir atteint 80% de mise sous traitement selon les directives de l'OMS de 2010. Les programmes de traitement de première ligne sont généralement basés sur une association de 2 INTI (AZT/d4T et 3TC ou plus récemment le TDF) et un INNTI (EFV ou NVP). La tendance à l'augmentation de la couverture de la thérapie antirétrovirale à travers l'Afrique masque d'énormes lacunes nationales (comme les ruptures des stocks de traitements, le manque d'éducation thérapeutique). En effet, sur les 21,2 millions de personnes éligibles au traitement antirétroviral selon les recommandations de l'OMS 2013, seulement 7,6 millions de personnes recevaient un traitement en fin 2012((UNAIDS) 2013). Bien que le nombre de personnes recevant un traitement antirétroviral continue d'augmenter dans ces pays, on estime que près des trois quarts des adultes vivant avec le VIH en Afrique sub-saharienne n'ont pas une réplication virale contrôlée. Cela est essentiellement dû au manque de suivi virologique dans ces pays. En effet, très peu de pays disposent d'un plateau technique adéquat (tests de CV et de génotype) ainsi que de ressources humaines formées pour la gestion des échecs thérapeutiques. L'évaluation de ces échecs peut différer selon les pays, elle peut être basée sur les marqueurs cliniques, immunologiques, virologiques ou même une combinaison de ces marqueurs. La prise en charge tardive des patients demeure un réel problème en Afrique. A cela s'ajoute, un manque de diversité aux différentes options possibles de 1ère ligne lors d'une intolérance aux molécules. Pour la plupart des patients dans ces régions ayant reçu une première combinaison à laquelle le virus est devenu résistant, se pose également le problème d'accès aux secondes lignes. Des études ont montré que seulement 1 à 5% des patients dans les pays à ressources limités sont sous 2ème ligne, car leurs prix restent élevés dans ces pays (Pujades-Rodriguez et al. 2008)**.**

Il est important, de décrire les problèmes de la résistance transmise, étudier la résistance acquise durant le traitement, décrire quels patients sont à risque de développer une multi résistance et discuter les option thérapeutiques disponibles, décrire la résistance aux nouvelles molécules et classes disponibles actuellement, expliquer comment le traitement empêche la transmission mère-enfant qui peut entrainer un risque de résistance, décrire les variants minoritaires chez les patients, enfin étudier la question de résistance dans l'utilisation des ARV comme prévention.

Pour atteindre, l'objectif zéro nouvelle infection à VIH, zéro discrimination et zéro décès lié au Sida de l'ONUSIDA, il faut un accès universel aux services de prévention et de traitement liés au VIH. Les partenaires internationaux des pays du Sud doivent donc maintenir leurs aides pour ces services de santé indispensables pour éradiquer le VIH. Cependant, les pays du

Sud devraient eux aussi élaborer des plans d'investissement nationaux pour la durabilité de ces services ainsi que de prendre des mesures pour améliorer leurs efficacités. Les pays doivent poursuivre énergiquement de multiples stratégies pour élargir la connaissance du statut VIH (la prévention, le dépistage) et un large accès aux traitements. Ces services doivent être décentralisés et les communautés habilitées à posséder leurs propres programmes de traitement du VIH, tout en respectant les règles internationales.

VII. CONTEXTE MALIEN

Le Mali est un pays continental situé en Afrique occidentale. D‟une superficie de 1.246.040 km^2, divisé en 8 régions économiques et administratives, dont Bamako et Ségou, ces 8 régions étant elles-mêmes divisées en cercles. Il abrite une population estimée à 14,5 millions d‟habitants en 2012, inégalement répartie sur le territoire entre les zones climatiques. Depuis début 2012, ce pays traverse une crise sociopolitique. Le système de santé malien est une structure pyramidale. Les centres de santé communautaires (CSCom) sont des petites unités de soins constituées d‟un infirmier, d‟une sage-femme et d‟un aide-soignant couvrant une population d‟environ 10 à 20000 personnes chacun. Lorsqu‟un CSCom ne peut gérer un cas, il le réfère au centre de soin de référence (CSRef) se trouvant au chef-lieu du cercle. Il possède de manière générale un bloc opératoire pour les gestes simples, avec quelques médecins, plusieurs infirmiers, un pharmacien et une sage-femme. Pour des examens plus poussés, les CSref peuvent référer leurs cas aux hôpitaux régionaux qui se trouvent au niveau des grandes villes et qui sont équipés notamment d‟un laboratoire. Enfin, au sommet de la hiérarchie se trouvent les hôpitaux nationaux, les hôpitaux du Point G, de Gabriel Touré et plus récemment « l‟Hôpital du Mali », situés à Bamako.

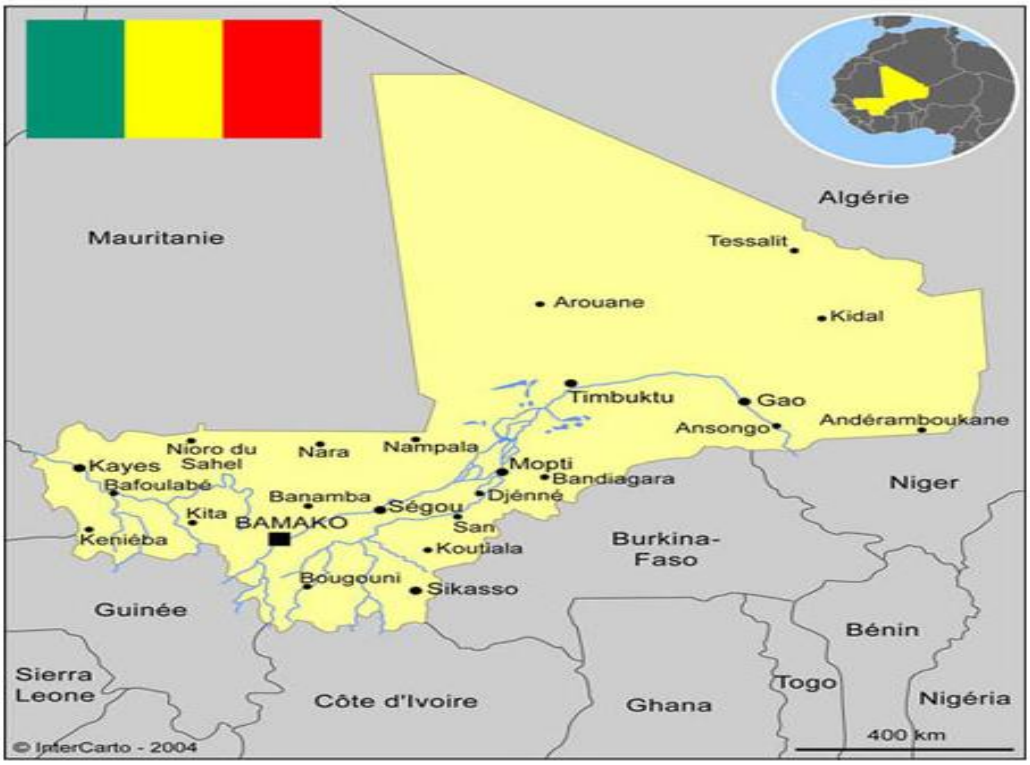


Figure 10. Carte géographique du Mali représentant ses différentes régions administratives et ses pays limitrophes (EDS V mali).

Prévalence du VIH

Selon les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2012 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographique et Santé au Mali (EDSM-V 2013) le Mali a enregistré une baisse de la prévalence du VIH de 1,3 à 1,1. Ces données font du Mali un pays à faible prévalence pour le VIH. Cependant, cette étude n'a pas été réalisée dans les régions du nord (Gao, Tombouctou et Kidal) directement touchées par la crise sociopolitique de mars 2012.

Les prévalences diffèrent selon plusieurs variables. Les femmes restent les plus touchées par l'épidémie que les hommes (1,3% vs 0,8%). La région la plus touchée est Bamako (1,7%), suivie de Ségou (1,2%) et de Kayes (1%), zones urbaines au cœur de multiples mouvements migratoires. Le pic de séroprévalence se situe dans la tranche d'âge 30-34 ans, et ce aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Quant aux groupes à risque, ce sont notamment les travailleuses du sexe les plus touchées, avec une prévalence du VIH de 24, 3%, et 2,9% des femmes enceintes sont séropositives (sur 6499 femmes enceintes dépistées).

Prise en charge des personnes vivant avec le VIH

La prise en charge antirétrovirale des personnes vivant avec le VIH/SIDA (PvVIH) a débuté en 1997 au centre d'écoute, de soins, d'animation et de conseils (CESAC) de Bamako, avec le soutien financier de la Coopération française. En novembre 2001, la réponse nationale se concrétise avec la mise en place de l'initiative malienne d'accès aux ARV (IMAARV) sur 3 sites prescripteurs (Hôpital du Point G, Hôpital Gabriel Touré et CESAC) et un laboratoire de référence (INRSP) à Bamako, initiative qui a fortement progressé au cours des dernières années. En effet, en avril 2004, une déclaration publique nationale annonce le SIDA comme une priorité avec la mise en place de la gratuité des ARV, des traitements pour les infections opportunistes et du suivi biologique. Le Mali est ainsi le 3ème pays africain à avoir pris cette décision après le Malawi et le Sénégal. En 2005, le plan sectoriel VIH/SIDA du ministère de la santé a fait de la décentralisation des soins aux régions et aux cercles une priorité nationale.
Dans le domaine de la prise en charge, d'énormes efforts ont été consentis, notamment la gratuité des soins et du traitement, l'ouverture des sites de traitement dans toutes les régions. A la fin de l'année 2012, cette politique a permis de mettre sous traitement 28571 patients. Ainsi, 85 sites de traitement et 347 sites PTME étaient fonctionnels au 31 Décembre 2012.
Les combinaisons thérapeutiques fixes sont privilégiées pour favoriser l'observance et diminuer le coût de la prise en charge pour le pays. Les molécules utilisées dans ces combinaisons sont celles qui figurent sur la liste des médicaments essentiels du Mali ou bénéficiant d'une autorisation spéciale de mise sur le marché et pré-qualifiées par l'OMS. L'initiation au traitement est fonction de l'état clinique, immunologique et/ou virologique du patient. Ainsi, le régime préférentiel actuel en 1ère intention, devant couvrir les besoins en traitement de la majorité des malades nouvellement inclus, est la combinaison tenofovir/ lamivudine/éfavirenz. Les régimes alternatifs sont utilisés en cas de contre-indication ou de toxicité à une ou plusieurs molécules. Dans les schémas de seconde intention, la lamivudine est toujours maintenue plus une autre inhibiteur nucléosidique/nucléotidique et un inhibiteur de protéase boosté (lopinavir/r ou atazanavir/r). En ce qui, concerne le régime de troisième ligne, il est recommandé de combiner un INTI sensible + darunavir/ritonavir + raltegravir. Ces dernières molécules ne sont pas disponibles pour tous les patients qui en ont besoin.
L'évaluation de l'échec thérapeutique au Mali est basée à la fois sur le suivi clinique et immuno-virologique. L'accès à la charge virale plasmatique se fait sur les critères ci-après :
-les patients initiant un traitement ARV,
-les patients sous traitement ARV, tous les 6 mois, sinon au moins une CV par an.

Cependant, à ce jour seulement 3 régions sur 8 ainsi que 4 laboratoires (dont deux de référence : l'Institut National de Santé Publique (INRSP) et le Centre de Recherche sur le VIH e la Tuberculose (SEREFO) dans la capitale réalisent la CV.

Une collaboration franco-malienne (les organisations ESTHER, SOLTHIS, à travers des équipes des services de maladies infectieuses et de virologie de l'hôpital de la Pitié Salpetrière en France et les autorités maliennes) avec l'appui d'une équipe américaine (Northwestern University, Chicago) a permis en 2009, l'installation d'un séquenceur au laboratoire SEREFO pour la réalisation des tests de résistance ainsi que l'accompagnement des cliniciens maliens pour une meilleure prise en charge des patients. Le laboratoire SEREFO est un centre de formation et de recherche sur le VIH et la tuberculose ainsi que sur les réponses immunitaires liées à ces deux maladies. Ce centre est situé à la Faculté de médecine, de pharmacie et odontostomatogie de l'Université des Sciences Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Mali. Désormais, une équipe travaille spécifiquement sur la résistance aux ARV chez les patients suivis au Mali. En collaboration avec la cellule sectorielle de lutte contre le Sida, cette équipe organise une fois par mois un staff clinico-biologique avec les cliniciens des différents services cliniques.

OBJECTIFS

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de réplication du virus, couplé à une faible fidélité de la TI ainsi qu'à des phénomènes de recombinaison génétique. Cette diversité est représentée par l'existence de nombreux sous-types et de formes recombinantes. La résistance du VIH-1 aux traitements antirétroviraux résulte de l'apparition de mutations dans les séquences codant pour les protéines virales ciblées par ces thérapeutiques (TI, protéase, intégrase et glycoprotéines d'enveloppe). Actuellement, de nouvelles molécules ARV sont en cours de développement ou déjà disponibles, comme les inhibiteurs non-nucléosidiques de la TI de deuxième génération, les inhibiteurs d'intégrase et les inhibiteurs d'attachement (inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule). La majorité des études virologiques au cours des essais cliniques concernant les ARVs portent sur le VIH-1 de sous-type B (sous-type prédominant dans les pays développés). Cependant, les sous types non B représentant 90% des infections mondiales ne sont que très peu évalués dans ces études. En effet, il existe peu d'études *in vitro* ou *in vivo* caractérisant la résistance des sous-types non-B vis à vis des nouvelles molécules. C'est pourquoi, il nous parait important d'étudier l'efficacité de ces nouvelles molécules antirétrovirales ainsi que les profils de mutations de résistance des VIH-1 non B vis-à-vis de ces molécules.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié la résistance primaire chez des patients infectés par le VIH dans deux contextes de prise en charge différents, au Sud (au Mali) et au Nord (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière). En effet, la transmission de souches résistantes a été mise en évidence aussi bien au Nord qu'au Sud et est liée à l'introduction des ARVs. Le Mali, situé en Afrique de l'ouest, est le 3ème pays africain à avoir rendu gratuit l'accès aux traitements ARV et le suivi biologique de l'infection VIH depuis 2004. Des premières études menées en 2005 et 2006 ont montré une faible prévalence (<5%) de la résistance primaire dans ce pays. Cependant, une introduction de plus en plus large du traitement ARV dans ce pays où de nouvelles contaminations sont toujours présentes rend nécessaire la surveillance de la transmission de souches résistantes au cours du temps. Nous avons donc évalué en 2010 la prévalence de mutations de résistance chez les patients nouvellement infectés et non traités dans deux grandes villes du pays (Bamako et Ségou). D'autre part, la rilpivirine est un INNTI de seconde génération. Son activité a été démontrée dans des études *in vitro* contre certains virus résistants aux INNTIs de première génération, très utilisés au Sud. Cette molécule a été approuvée en combinaison avec l'emtricitabine et le tenofovir dans certains pays développés comme régime de première intention. L'objectif de ce

second travail est d'évaluer la prévalence des mutations de résistance associées à la rilpivirine, ainsi que celles associées aux INTIs de la combinaison, chez des patients naïfs infectés par les sous-types B et non B. Ces études sont importantes car nous savons que la présence de souches résistantes chez les patients naïfs entraîne un risque élevé d'échec virologique après l'initiation d'un premier de traitement ARV.

Par ailleurs, des études ont montré une émergence de mutations de résistance après l'accès élargi aux traitements ARV dans les pays du Sud chez les patients traités. D'autant plus que le suivi virologique est rare dans ces pays où une majorité de patients sont sous un traitement de première ligne. Les résultats des échecs précoces (dans les 24 mois après l'initiation du traitement) sont contradictoires. Cependant, peu de données sont disponibles sur la résistance après une longue période d'utilisation des traitements de première ligne en Afrique. C'est pourquoi dans la deuxième partie de ce travail, nous avons caractérisé le profil de résistance génotypique chez des patients sous traitement de première ligne depuis au moins trois ans à Bamako. Nous avons également évalué l'impact des mutations observées sur l'efficacité potentielle des traitements de seconde ligne.

En fin, la troisième partie de cette thèse concerne l'étude du polymorphisme au niveau des codons nucléotidiques codant pour les acides aminés impliqués dans la résistance aux nouvelles molécules. En effet, certains auteurs ont montré qu'en fonction des sous-types viraux, le type et le nombre de changements nucléotidiques nécessaires pour la modification d'un acide aminé pouvaient influencer la sélection de mutations de résistance. Les INNTIs de première génération sont fréquemment utilisés en Afrique de l'Ouest où circulent majoritairement le sous-type CRF02_AG. Nous avons comparé la barrière génétique à la résistance entre les sous-types B et CRF02_AG chez les patients naïfs d'ARV pour la rilpivirine et l'étravirine, inhibiteurs de deuxième génération dans un premier travail. Puis, dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés à une nouvelle classe d'inhibiteurs d'entrée du VIH qui est en développement, les inhibiteurs d'attachement. L'entrée du virus dans la cellule hôte est une étape clé dans la réplication du VIH-1. Ainsi un nouvel inhibiteur d'attachement, le BMS-626529 est en cours de développement. Nous nous sommes intéressés à l'étude de la barrière génétique de cette molécule. Pour ce travail, nous avons comparé la variabilité du gène *env* (particulièrement la gp120) entre le sous-type B et des sous-types non B (C, D, CRF02_AG et CRF01_AE).

RESULTAT

ARTICLE 1

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 2013

Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in Newly HIV-Infected and Untreated Patients in Ségou and Bamako, Mali

AmoustaphaIssiaka Maiga, **Djeneba Bocar Fofana**, AichatouChehy Maiga, Fodie Diallo, Zaina Ait-Arkoub, FatoumataDaou, MamadouCissé, Yaya ditSadioSarro, AboubacarAlassaneOumar, AliouSylla, Christine Katlama, BabafemiTaiwo, Robert Murphy, Anatole Tounkara, Anne-Geneviève Marcelin et Vincent Calvez

Résistance aux antirétroviraux transmise chez des patients infectés par le VIH-1 nouvellement diagnostiqués et non traités à Ségou et à Bamako, Mali.

A l'instar des autres pays africains et grâce aux efforts nationaux et internationaux, l'introduction au Mali des médicaments génériques à dose fixe ainsi que d'autres combinaisons d'ARV à prix abordables a permis un accès élargi aux traitements pour les patients infectés par le VIH. Toutefois, des études réalisées dans les pays industrialisés ont montré une prévalence non négligeable de la résistance primaire ou transmise chez les patients naïfs (environ 10%), liée à un large accès aux ARVs dans le cadre de la prise en charge de cette infection. Il est donc important de surveiller de la même manière la transmission de la résistance en Afrique chez les personnes nouvellement diagnostiquées. Ces études, recommandées par l'OMS, permettent d'identifier les profils de mutations de résistance primaire et leur évolution au cours du temps afin d'optimiser éventuellement le choix des premières lignes de traitement.

Au Mali, les premières études sur la résistance primaire, réalisées entre 2005 et 2006 ont montré de faibles taux de résistance d'environ 2%. Une étude réalisée plus récemment en 2009 montre un taux modéré avec 9% de mutations de résistance chez les patients naïfs d'ARV. D'autre part, une étude sur les patients en échec de deuxième ligne de traitement a montré une prévalence de 8,6% de virus multirésistants à toutes les molécules disponibles

dans le pays, ces virus résistants pouvant être transmis à de nouveaux patients.

Dans l'étude présentée ici, les patients étudiés ont été recrutés en mars 2010, incluant tous les patients âgés de plus de 18 ans et nouvellement diagnostiqués pour le VIH-1 dans les centres de conseil et de dépistage volontaires de deux grandes villes du Mali (Bamako et Ségou).

Le séquençage des gènes de a été effectué selon la méthode ViroSeq (Abbott et Celera Diagnostics). Les mutations de résistance associées aux ARV ont été identifiées en utilisant la liste des mutations de résistance transmise de l'OMS 2009. L'analyse phylogénétique a été effectuée en utilisant la méthode de neighbor-joining.

Nous avons ainsi recruté 54 patients. Globalement, 51/54 (94,4%) des échantillons ont pu être séquencés. L'âge médian des patients était de 24 ans (IQR 22-27) et le nombre médian de CD4 était de 380 (IQR 340-456) cellules/mm^3. Les analyses phylogénétiques montrent que le recombinant CRF02_AG est toujours le sous-type prédominant au Mali avec une prévalence de 66,7%, suivie par le CRF06_cpx (12%) et le CRF09_cpx (4%). Concernant la résistance, nous avons identifié des mutations de résistance chez 4 patients, soit une prévalence globale de 7,9% [(IC 95) 2,2 à 18,9%]. Deux patients (4%) étaient porteurs des mutations (M184V ou T215Y) associées à la résistance aux INTI, deux patients (4%) porteurs de la mutation K103N associée à la résistance aux INNTI et un patient (2%) porteur de la mutation I54V associée à la résistance aux IP. Le niveau de résistance primaire global est supérieur à ceux rapporté par Derache et al, 1,5% et 2,5% en 2005 et 2006, respectivement. En revanche, nos résultats sont similaires à ceux observés par Haidara et al. soit 9% dans une étude réalisée en 2009 dans le même pays. Ces résultats montrent donc une augmentation de la résistance primaire au cours du temps au Mali en raison probablement de l'accès élargi aux ARV et du manque de suivi virologique. Ces résultats soulèvent donc des préoccupations au sujet de l'utilisation systématique d'un INNTI et deux INTIs en premier schéma thérapeutique sans effectuer de tests de résistance au préalable, car les mutations de résistance détectées peuvent compromettre l'efficacité des INTI (AZT, d4T, 3TC, FTC) et des INNTI (NVP et EFV) utilisés dans le traitement de première ligne. Nos résultats mettent en évidence la nécessité d'optimiser le contrôle virologique chez les patients sous traitement et d'élargir la surveillance de la résistance primaire afin d'optimiser les premières lignes de traitement à base d'INNTI dans les pays du Sud.

Cette étude nous a permis d'évaluer la prévalence de la résistance primaire à Ségou et Bamako, 2 grandes villes du Mali. Par la suite, il nous semble intéressant d'élargir cette recherche à d'autres régions du pays, sur un plus grand nombre de patients de façon à obtenir des estimations plus précises de la résistance primaire et de son évolution dans tout le pays.

ARTICLE 2

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013

Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naive patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses

Sidonie Lambert-Niclot, Charlotte Charpentier, A. Storto, **Djeneba Bocar Fofana**, Cathia Soulié, Slim Fourati, Benoit Visseaux, Marc Wirden, LauranceMorand-Joubert, Bernard Masquelier, Phillippe Flandre, Diane Descamps et Anne-Genevive Marcelin

Prévalence de mutations préexistantes associées à la résistance à la rilpivirine, emtricitabine et au ténofovir chez les patients naïfs d'antirétroviraux infectés par les sous-types B et non B du VIH-1.

Les recommandations Françaises et Européennes préconisent actuellement de traiter les patients en première ligne de traitement avec une combinaison de 2 INTIs plus un 3ème agent d'une autre classe, comme un IP, un INNTI ou un INI. Malgré l'efficacité de ces premières lignes, il existe un besoin constant de nouvelles molécules ayant une activité sur les virus résistants aux molécules de première génération. Les INNTIs de seconde génération, comme l'ETR et la RPV sont des molécules ayant une activité sur certains virus résistants aux INNTIs de première génération et comportant de moindres effets secondaires. Ainsi, la RPV, a été récemment approuvée dans une combinaison fixe avec le FTC et le TDF chez les patients naïfs d'antirétroviraux.

Le but de notre étude était d'évaluer, chez des patients naïfs de traitement ARV, la prévalence des mutations de résistance associées à la RPV, FTC et au TDF décrites *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons analysé les séquences de la TI chez des virus provenant de 1729 patients naïfs réalisées entre 2008 et 2011. Nous avons étudié les mutations de résistance primaires associées à la RPV: K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, H221Y, F227C et M230I/L et d'autres mutations potentiellement associées à la résistance à cette molécule:

V90I, L100I, K101T, E138S, V179D/I, Y188L, V189I, G190A/E/S et M230I/L ainsi que les mutations M184V/I et K65R associées FTC et au TDF respectivement.

Sur 1729 séquences analysées, environ 50% étaient de sous-type B et 50% de sous-type non-B, incluant une majorité de CRF02_AG. Les mutations de résistance primaire associées à la RPV étaient retrouvées chez 4,6% des patients et les mutations les plus fréquemment observées étaient : E138A (3%), E138K (0,3%), H221Y (0,3%), E138G (0,2%) et Y181C (0,2%). Ces mutations étaient retrouvées de façon similaire entre les sous-types B et non-B selon la liste de mutations de l'IAS. Les autres mutations potentiellement associées à la résistance à la RPV (non associées à l'échec virologique dans les études cliniques de phases 3) étaient les mutations V179I (8,4%), V90I (3,8%) et V189I (2,3%). Finalement, selon l'algorithme de l'ANRS (www.hivfrenchresistance.org), nous trouvons de façon globale que 4,9% des échantillons étaient résistants à la RPV, 3,7% pour le sous-type B *versus* 6% pour le sous-type non-B (p=0,02). La prévalence des mutations K65R et M184V/I était respectivement de 0,06% et 1%. En résumé, la prévalence de mutations de résistance à la RPV, au FTC et au TDF, est retrouvée à un taux faible chez les patients naïfs de traitement. Néanmoins, les mutations de résistance sont plus fréquemment retrouvées chez les virus de sous-type non-B *versus* sous-type B. Ces résultats seront à prendre en compte, en cas d'utilisation de la RPV en absence de test de résistance dans les pays du Sud.

ARTICLE 3

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014

High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali

Djeneba Bocar Fofana, Cathia Soulié, Sidonie Lambert-Niclot, Mariam Sylla, Zaina Ait-Arkoub, Fodié Diallo, Issouf Alassane Maiga, Ousmane Koita, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Amoustapha Issiaka Maiga,

Haut niveau de résistance chez des patients en échec thérapeutique sous première ligne de longue durée au Mali.

En Afrique, l'accès aux traitements ARV devient de plus en plus important d'année en année. Néanmoins, la plupart des patients restent souvent sous un régime de première ligne pendant plusieurs années. Peu de données sont disponibles sur les conséquences d'un premier traitement ARV de longue durée, les outils virologiques nécessaires à ces études, en particulier le séquençage, étant rarement disponibles en Afrique. En effet, les données disponibles au Mali concernent principalement, la résistance primaire chez des patients infectés par le VIH-1 nouvellement diagnostiqués et non traités, ainsi que les profils de résistance chez des patients en échec de traitement de première ligne après au plus 24 mois de traitement.

Notre équipe de recherche en collaboration avec le laboratoire SEREFO de Bamako au Mali, a mené une étude dans différents centres cliniques à Bamako afin de caractériser les profils de résistance chez 84 patients sous traitement de première ligne depuis au moins 3 ans et en échec virologique (CV ≥ 1000 copies/mL). L'analyse génotypique des gènes de la TI et de la protéase a été réalisée avec le test commercial ViroSeq. Les séquences ont été interprétées selon la plus récente version de l'algorithme de l'ANRS (http://www.hivfrenchresistance.org/).

En accord avec les lignes directrices nationales du moment, les patients ont été traités principalement avec deux INTIs et un INNTI. La majorité des patients était sous les combinaisons: lamivudine/ zidovudine/névirapine (59%) ou lamivudine/stavudine/névirapine

(35%). L‟analyse des données montre une durée médiane de traitement de 60 mois avec un taux de CD4 médian de 292 cellules/mm^3 (IQR 6-1319) et une charge virale médiane de 28266 copies/mL (IQR 1000-2938495). La médiane du score de sensibilité génotypique (GSS) était de 1 (IQR 1-4), signifiant qu‟au moins une molécule restait active dans la combinaison que prenaient les patients. Du point de vue de la résistance, 92% des patients avaient des virus résistants à au moins une molécule et 61% présentaient une résistance à 2 classes thérapeutiques. Nous avons observé une forte prévalence de mutations de résistance, en particulier aux INTIs (78%) et aux INNTIs (82%).La prévalence de la résistance aux INNTIs de première génération était de 76% pour l'EFV et 77% pour la NVP. Ces résultats sont en accord avec des études réalisées en Afrique montrant un taux élevé de résistance aux INNTIs de première génération qui compromet l‟utilisation des INNTIs de deuxième génération (ETR et RPV) dans ces pays. Bien que l'ETR et la RPV ne soient pas utilisés au Mali pour une première ligne de traitement, nous avons montré dans cette étude que le taux de résistance à ces INNTIs de seconde génération était de 34% et 49% respectivement. Ceci confirme le risque d'accumulation de mutations résistance aux INNTIs chez les patients en échec de première ligne au long cours en Afrique. Ainsi, ces résultats impliquent la nécessité de renforcement de la surveillance de la CV en routine dans les pays du Sud. Nous avons également mis en évidence dans ce travail que les facteurs associés à la résistance aux INTIs comme l‟abacavir et le tenofovir, étaient une CV élevée à l‟échec, un taux de CD4 bas, un GSS bas, une longue durée de traitement et un nombre de mutations élevé. Pour les INNTIs, les facteurs associés à la résistance étaient un nombre de mutations élevé aux INTIs et INNTIs. L‟analyse phylogénique des séquences montre une diversité génétique élevée, avec une majorité de CRF02_AG mais également différents sous-types comme CRF30_0206, CRF06_cpx, CRF01_AE, CRF45_cpx, CRF09_cpx, A, C, D, F2, G et des formes recombinantes non identifiées ou URF.

En conclusion, cette étude montre un niveau élevé de résistance aux INNTIs de première et de seconde génération chez les patients qui ont reçu une première ligne de traitement de longue durée (médiane de 60 mois) comportant un INNTI de première génération. Ces données montrent qu‟il est crucial d‟élargir l‟accès des tests virologiques (charge virale et tests de résistance) dans les pays à ressources limitées, afin d‟éviter les échecs virologiques prolongés. Ceci, afin de limiter l‟accumulation de mutations de résistance et de préserver les options thérapeutiques futures, dans un contexte ou l‟accessibilité aux molécules de deuxième et troisième lignes reste limitée.

ARTICLE 4

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013

Genetic barrier to the development of resistance to rilpivirine and etravirine between HIV-1 subtypes CRF02_AG and B

Djeneba Bocar Fofana,Cathia Soulié, Amoustapha Issiaka Maiga, Slim Fourati, Isabelle Malet, Marc Wirden, Anatole Tounkara, Hamar Alassane Traoré, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Sidonie Lambert-Niclot,

Comparaison de la barrière génétique à la résistance pour la rilpivirine et l'étravirineentre les sous-types B et CRF02_AG.

Dans le développement de la résistance aux ARVs, la barrière génétique se définit par le nombre de mutations nécessaire pour qu'un virus acquière la résistance vis-à-vis d'un ARV. Elle dépend du nombre de mutations au niveau nucléotidique qui entraîne un changement d'acides aminés et est influencée par les caractéristiques de ces mutations, transitions ou transversions, requises pour évoluer d'un codon sauvage vers une substitution associée à la résistance. En effet, les transitions (remplacement d'une base purique par une autre base purique A↔G ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique C↔T) sont pour des raisons conformationnelles 2,5 fois plus fréquentes que les transversions (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique et vice versa : A↔C, A↔T, G↔C, G↔T). Ainsi, la grande variabilité au niveau nucléotidique qui existe entre les sous-types du VIH-1 pourrait avoir un impact au niveau de la barrière génétique vis-à-vis des différents médicaments antirétroviraux.

Les INNTIs constituent une classe thérapeutique importante dans la prise en charge des patients infectés par le VIH-1. La rilpivirine (RPV) et l'étravirine (ETR) sont des inhibiteurs de deuxième génération de cette classe qui montrent une activité antirétrovirale sur des souches de VIH-1 sauvages, ainsi que certaines souches résistantes aux INNTI de première

génération (nevirapine, NVP et éfavirenz, EFV). Bien que les INNTIs soient fréquemment utilisés et notamment en Afrique, peu de données sont disponibles sur l'efficacité et la résistance des molécules de seconde génération en fonction du sous-type viral. Par ailleurs, des études *in vivo* et *in vitro* ont permis de mettre en évidence différentes mutations associées à la résistance : 18 mutations pour l'ETR et 15 pour la RPV.

Dans ce travail, nous avons étudié les différences de barrière génétique à la résistance pour la RPV et l'ETR entre le sous-type B, très fréquent dans les pays développés comme la France et le sous-type CRF02_AG, très prévalent en Afrique de l'Ouest et en augmentation en France chez des patients naïfs de traitement antirétroviral. Pour cela, le gène de la TI a été amplifié et séquencé et les codons identifiés au niveau des positions impliquées dans la résistance à ces molécules ont été étudiés.

Nous avons analysé 267 séquences nucléotidiques (136 de sous-type B et 131 de sous-type CRF02_AG) au niveau de 25 substitutions associées à la résistance à ces molécules correspondant à 12 positions d'acides aminés de la TI. La majorité des positions, au niveau acides aminés, étudiées (7/12) était conservée entre les deux sous-types, conduisant à une barrière génétique similaire. Au niveau des 5 autres positions (90, 98, 179, 181 et 227), des différences de codons prédominants étaient observées entre les 2 sous-types avec un effet sur la barrière génétique uniquement au niveau du codon 179 (avec un score de 2,5 *versus* 3,5 pour V179D et un score de 2,5 *versus* 5 pour V179F respectivement pour le sous-type B *versus* le sous type CRF02_AG).

En conclusion, un degré élevé de conservation a été mis en évidence pour la majorité des acides aminés impliqués dans la résistance à l'ETR et à la RPV entre les sous-types B et CRF02_AG. Pour la RPV, la barrière génétique à la résistance était similaire entre les deux sous-types. Néanmoins, pour l'ETR le sous-type CRF02_AG a montré une barrière génétique à la résistance plus élevée pour acquérir les mutations V179D et V179F en comparaison avec le sous-type B. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait être plus difficile pour des virus de sous-type CRF_02AG de devenir résistant à l'ETR en cas d'échec virologique. Il sera donc intéressant de suivre l'utilisation de l'ETR et de la RPV chez les patients infectés par des sous-types non-B. Il sera également intéressant de faire une étude similaire avec le sous-type C, lequel représente 50% des infections mondiales liées au VIH-1.

ARTICLE 5

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014

Genetic Barrier for Attachment Inhibitor BMS-626529 resistance in HIV-1 B and non B subtypes

Djeneba Bocar Fofana, Charlotte Charpentier, Amoustapha Issiaka Maiga, Sidonie Lambert-Niclot, Sophie Sayon, Nathalie Désiré, Anne Simon, YazdanYazdanpanah, Christine Katlama, Diane Descamps, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Cathia Soulié

Barrière génétique à la résistance pour l'inhibiteur d'attachement BMS-626529 entre les sous-types B et non-B.

Les inhibiteurs d''attachement représentent une nouvelle classe d''inhibiteur d''entrée dans la thérapie antirétrovirale du VIH-1. Ces inhibiteurs interviennent au niveau de la liaison entre la gp120 et le récepteur CD4 de la cellule hôte. En effet, ils empêchent le contact entre la gp120 et le récepteur CD4 de la cellule hôte, bloquant ainsi le changement de conformation de la gp120 et donc l''entrée du virus. La firme Bristol Myers Squibb a mis au point un nouvel inhibiteur d''attachement, le BMS-626529 (en cours de développement). Ce dernier a montré une activité antirétrovirale contre la majorité des souches de laboratoire de VIH-1 et les isolats cliniques du VIH-1, exceptés le sous-type CRF01_AE et le VIH-1 de groupe O. De plus, son activité *in vitro* semble indépendante du tropisme viral (R5 et X4). Cependant, des passages *in vitro* du VIH-1 en présence de cet inhibiteur ont montré l''apparition de substitutions dans la gp120 (L116P, A204D, M426L, M434I-V506 et M475I) se trouvant au niveau du site de liaison avec le CD4 et qui confèrent différents niveaux de résistance au BMS-626529.

Par ailleurs, les protéines gp120 et gp41 codées par le gène de l''enveloppe du VIH-1 sont très variables entre les sous-types, pouvant atteindre jusqu''à 35% de variabilité (Gaschen et al.

2002).Le nouvel inhibiteur d'attachement, BMS-626529 agissant au niveau de la liaison de ces deux protéines, il nous semblait intéressant d'étudier la barrière génétique vis-à-vis de cette molécule entre différents sous-types du VIH-1.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au sous-type B (fréquemment retrouvé en France) et à différents sous-types non-B (C, D, CRF02_AG et CRF01_AE) circulant majoritairement dans les pays du Sud. Nous avons analysé 9 substitutions au niveau de la gp120 associées à la résistance au BMS-626529 correspondant à 7 positions d'acides aminés (116, 204, 375, 426, 434, 475 et 506). Nous avons ainsi étudié analysé 300 séquences nucléotidiques provenant de patients naïfs de traitement antirétroviral (60 pour chacun des 5 sous-types mentionnés ci-dessus).

Pour chacune des positions, nous avons calculé le nombre de transitions et/ou transversions requises pour conférer un changement d'acides aminés associé à la résistance au BMS-626529.

Les résultats montrent que les acides aminés 116, 426, 434, 475 et 506 sont assez bien conservés entre les 5 sous-types, conduisant à une barrière génétique similaire vis-à-vis du BMS-626529. Toutefois, concernant les acides aminés aux positions 116 et 506 pour le sous type CRF02_AG et 116 pour le sous type C, nous avons observé une barrière génétique plus élevée par rapport aux autres sous-types, suggérant plus de difficultés pour ces sous-types à acquérir des mutations de résistance à ces positions. Globalement, ces données sont en accord avec des études sur d'autres classes d'ARV qui ont montré un haut degré de conservation pour de nombreux codons entre les différents sous-types. Au niveau des positions 204 et 375, différents codons prédominants étaient observés selon les sous-types bien qu'ils n'aient pas d'effet sur la barrière génétique. Néanmoins, pour la position 375, quelques séquences de sous-type CRF02_AG ont montré une plus faible barrière génétique pour les mutations S375M/T. Cette position a été impliquée dans la résistance naturelle du sous-type CRF01_AE au BMS-626529. Dans d'autres études, le sous-type CRF02_AG a également montré une plus haute barrière génétique comparée au sous-type B à quelques positions au niveau des gènes de l'intégrase, de la protéase et de la TI.

La résistance primaire au BMS-626529 a été observée au niveau de 4 positions (375, 426, 434 et 475) du gène de la gp120. Plus particulièrement, pour le sous-type CRF01_AE qui présente la mutation S375H/T dans 100% des séquences étudiées et le sous-type D qui présente la mutation M426L dans 25% des séquences étudiées. Ces résultats confirment que certaines mutations de résistance décrites et associées au BMS-626529 peuvent exister naturellement

dans les séquences de virus de patients naïfs.

En résumé, en dépit d'une haute variabilité de l'enveloppe du VIH-1, la barrière génétique est similaire pour la plupart des codons entre différents sous-types (B, C, D, CRF02_AG, excepté le CRF01_AE) pour les mutations de résistance associées à l'inhibiteur d'attachement BMS-626529. Cependant, certaines séquences de sous-types CRF02_AG et C ont montré une haute barrière génétique à certaines positions de mutation (116 et 506). Ces résultats pourraient être liés au fait que, la plupart des mutations impliquées dans la résistance à cet inhibiteur d'attachement sont localisées dans la région conservée de l'enveloppe du VIH-1.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Alors que l'épidémie mondiale de l'infection à VIH entre dans sa quatrième décennie, de nouvelles molécules ou classes thérapeutiques sont toujours recherchées ou en cours de développement afin de relever le défi du traitement au long cours avec les phénomènes de résistance liés à ces traitements. La disponibilité de nouveaux médicaments suscite un grand espoir pour les pays du Sud, en particulier l'Afrique Sub-saharienne où se trouve la majorité des patients infectés par le VIH. L'accès aux ARVs dans cette région s'est beaucoup amélioré durant la dernière décennie, avec de plus en plus de patients sous traitement grâce aux efforts locaux et internationaux. Le VIH depuis sa découverte est caractérisé par une très grande diversité génétique. Aujourd'hui, 4 groupes de VIH-1 ainsi que de nombreux sous-types et formes recombinantes ou CRF existent. Une part énorme des infections est due au groupe M comprenant 9 sous-types (A-D, F-H, J et K) et près de 60 CRFs. Ainsi, 90% des infections mondiales sont imputables aux virus de sous-type non B circulant majoritairement dans les pays du Sud ou pays à ressources limitées. C'est pourquoi, il est très important d'étudier la résistance des sous-types non B vis-à-vis des ARVs, particulièrement vis-à-vis des nouvelles molécules ou classes, car les profils de résistance peuvent varier selon le sous-type. Dans ce travail, nous avons donc caractérisé les profils de mutations de résistance (transmise ou primaire et acquise) pour de nouvelles molécules chez des patients infectés par des sous-types non B. Nous avons également exploré la capacité des différents sous-types (B et non B) du VIH-1 à acquérir des mutations de résistance.

La stratégie globale de l'OMS pour la prévention et l'évaluation de la résistance aux traitements ARV regroupe un certain nombre de composantes, dont l'évaluation de la résistance primaire chez les personnes récemment infectées et non traitées, ainsi que l'étude de la résistance acquise chez les populations recevant un traitement ((OMS) 2012). La plupart des pays du Sud ne disposent pas de moyens techniques et financiers nécessaires pour s'offrir ces évaluations très importantes pour la prise en charge des patients. Le Mali, à travers des collaborations fructueuses avec des équipes françaises de recherche (services de Virologie et de Maladies Infectieuses de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière) réalise ces études de façon régulière. Grâce à cette collaboration franco-malienne à travers les organisations non gouvernementales ESTHER et SOLTHIS et l'aide de l'équipe du Pr Murphy RL. De l'université Northwestern de Chicago, le Mali dispose désormais d'un séquenceur et peut mener des études de résistance non seulement nationales, mais aussi des collaborations avec

d‟autres pays africains qui ne disposent pas de cette technologie. Ces études sont d‟autant plus importantes que dans beaucoup de pays africains la prévalence de la résistance augmente depuis un accès élargi aux traitements ARV.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié la résistance primaire dans deux contextes différents : un premier travail porte sur l‟évaluation de la résistance primaire chez les patients nouvellement diagnostiqués et non traités dans deux grandes villes du Mali (Bamako et Ségou). Le second travail consiste à évaluer dans un contexte européen, la prévalence des mutations préexistantes associées à l‟association TDF/FTC/RPV chez des patients naïfs suivis à l‟hôpital de la Pitié Salpêtrière, France.

Dans les pays industrialisés, des études ont mis en évidence la transmission de souches résistantes très tôt après un accès facilité aux traitements ARV. Ces études montrent qu'une plus grande couverture de la thérapie antirétrovirale est associée à une prévalence plus élevée de la résistance primaire, notamment la résistance aux INNTIs ((OMS) 2012). Par exemple, une récente revue révèle une prévalence globale de 12,9% en Amérique du Nord et 10,9 % en Europe (Frentz et al. 2012). C‟est pourquoi, en France et dans d‟autres pays développés, avant la mise sous traitement, un test de résistance génotypique est recommandé afin d‟adapter le traitement de première ligne en fonction de la présence de mutations de résistance. Une augmentation de la résistance primaire a été également mise en évidence dans plusieurs pays africains passant de 2,8% avant 2001 à 5,3% après 2003 (Frentz et al. 2012). Ces données reflètent bien, l‟histoire de l‟accès aux traitements dans les pays africains qui n‟a effectivement débuté qu‟après les années 2000. Ainsi, la surveillance de cette résistance primaire est une question importante en Afrique où peu de molécules antirétrovirales sont encore disponibles. Depuis, l‟OMS a édité certaines recommandations pour évaluer la résistance primaire dans tous les pays où l‟accès aux traitements est de plus en plus important. Au moment de la réalisation de cette étude, l‟OMS recommandait l‟étude de la transmission de souches résistantes chez un nombre de 47 patients diagnostiqués consécutivement positifs pour le VIH-1. Ces patients devaient correspondre aux critères listés par l‟OMS, à savoir que la personne devait avoir moins de 25 ans et que si c‟était une femme, elle ne pouvait pas être incluse dans l‟étude si elle avait déjà eu un enfant (Bennett et al. 2008). Enfin, les patients devaient être diagnostiqués de façon précoce. Actuellement, les critères d‟inclusion demeurent inchangés par rapport aux directives OMS précédentes pour l‟évaluation de cette résistance transmise, mais pour maximiser l‟inclusion d‟individus récemment infectés (dans

les 3 dernières années, des paramètres épidémiologiques (un âge <25 ans) ou des paramètres biologiques (CD4 >500 cellules/µL) devraient être utilisés ((OMS) 2012). Cependant, à la différence des précédentes directives, l'OMS propose une méthode permettant de calculer une estimation de la résistance transmise représentative au niveau national. En effet, lorsque la taille de l'échantillon est <50, le résultat sera une prévalence ponctuelle et d'une utilité limitée pour la prise de décision programmatique. Une taille comprise entre 50 et 200 peut être envisagée, cependant l'idéal est une taille d'échantillon > 200 pour obtenir des résultats significatifs.

Au Mali, cela fait plus de 10 ans que les traitements ARV sont gratuits avec un nombre de patients croissant sous ARV chaque année. En 2012, près de 29000 patients étaient sous traitement dans tout le pays avec une séroprévalence globale de 1,1% (EDSM-V 2013). Il faut donc s'attendre à une augmentation de la résistance primaire, comme celle observée dans les pays du Nord. D'où l'intérêt d'une évaluation régulière de la transmission des souches résistantes dans ce pays. Cependant, le diagnostic de l'infection à VIH étant très tardif dans les pays du Sud et particulièrement au Mali, il nous a semblé difficile de mettre en place une évaluation comme le recommandait initialement l'OMS (anciens critères). Dans notre étude, nous avons choisi de sélectionner les patients de façon moins restrictive sur le seul critère de l'infection à VIH. Les résultats immunologiques chez nos patients confirment bien, que le diagnostic du VIH se fait relativement tard par rapport à l'évolution naturelle de la maladie. De plus, nous ne disposions pas d'outils pour dater l'infection chez nos patients. Une des limites potentielles de notre approche est de minimiser la prévalence réelle de la transmission des mutations de résistance en incluant des patients infectés depuis un certain temps. En effet, la persistance de mutations de résistance en l'absence d'ARV ne concerne pas toutes les mutations. Certaines disparaissent rapidement en l'absence de pression antirétrovirale. Toutefois, ce type d'approche est facilement applicable sur le terrain et permet de donner une estimation de la prévalence de la résistance primaire. Ce type d'approche est d'ailleurs désormais recommandé par l'OMS depuis mars 2014 dans le cadre de l'évaluation de la résistance pré-thérapeutique.

Dans la première partie de notre travail sur la résistance primaire au Mali, nous avons montré une prévalence de 7,9% de mutations de résistance primaire chez les patients nouvellement diagnostiqués en mars 2010 et non traités à Bamako et à Ségou, au Mali. Deux études de résistance primaire ont été réalisées sur deux années consécutives, en 2005 et 2006 dans ce

pays, avec des taux plus faibles de 2 et 2,5%, respectivement (Derache et al. 2008). Cependant une autre étude réalisée en 2009 par Haidara a montré un taux plus élevé avec 9% de résistance primaire (Haidara et al. 2010). Ces résultats montrent une prévalence croissante de la résistance primaire au Mali. Cette augmentation s'explique par la couverture croissante des ARV dans le pays. En effet, un faible nombre de personnes était sous ARV en 2005 (environ 5000), alors qu'en 2010, près de 21000 personnes étaient initiées aux traitements dans ce pays (EDSM-IV 2006; EDSM-V 2013). Ces données sont similaires à celles observées dans d'autres pays d'Afrique de l'ouest. Dans la plupart des pays africains, au début de l'accès aux ARV, la transmission des virus résistants était limitée: par exemple pour la Tanzanie, le Malawi, l'Ethiopie et l'Afrique du Sud, la prévalence de la résistance primaire était < 5% (Abegaz et al. 2008; Kamoto and Aberle-Grasse 2008; Pillay et al. 2008; Somi et al. 2008). D'autres pays, comme la Côte d'Ivoire, avaient évalué cette transmission à 6%, valeur très légèrement élevée, peut être due à un accès plus ancien aux ARV (Toni et al. 2007). Une autre étude à Yaoundé (Aghokeng et al. 2011), au Cameroun, a montré une prévalence croissante de mutations de résistance chez les patients naïfs au fil du temps : 0,0% en 1996-1999 ; 1,9% en 2001 ; 4,1% en 2002 et 12,3% en 2007. De plus en 2011, 8,6% des jeunes adultes nouvellement diagnostiqués au VIH-1 en Ouganda avaient de la résistance primaire, comparativement à 0% dans une étude menée quatre ans plus tôt (Ndembi et al. 2011). Des études récentes confirment ces résultats avec des niveaux modérés 5-15% à Ouagadougou, Burkina Faso (Somda et al. 2012), au Kwa-Zulu-Natal, Afrique du Sud (Hunt et al. 2012), à Kampala en Ouganda (Ndembi et al. 2011) et à Mombasa au Kenya (Sigaloff et al. 2012).

Un point essentiel, est que la prévalence de la résistance primaire peut différer selon les régions africaines. En effet, une évaluation récente de la résistance chez 26 102 patients non traités dans 42 pays (Gupta et al. 2012) a montré des résultats différents selon les pays. L'Est du continent a enregistré le taux le plus élevé avec une augmentation de 29% par an, 14% en Afrique australe, 3% à l'ouest et au centre du continent (Gupta et al. 2012). Une autre revue plus récente a rapporté cette augmentation avec une prévalence de 0,9% à 7,4% après 8-9 ans à l'Est et de 2,1 à 3,7% en 7 ans en Afrique du Sud dans les programmes de traitement ARV (Lessells et al. 2013). Ces résultats variables selon les pays s'expliquent par un accès différent au traitement ARV dans les régions d'Afrique. En effet, Il y a une grande disparité dans ces régions, car les services de traitement antirétroviral sont beaucoup plus disponibles en Afrique orientale et australe qu'en Afrique de l'Ouest et du centre ((OMS) 2013). Toutefois, il ressort

dans de nombreuses enquêtes effectuées par l'OMS que la prévalence de la résistance primaire a globalement augmentée entre 2004 et 2010, principalement la résistance aux INNTIs chez les populations récemment infectées dans les pays africains ((OMS) 2012). Cette augmentation n'est pas surprenante, compte tenu du large accès aux ARV ces dernières années et surtout de l'utilisation préférentielle des INNTIs dans les combinaisons thérapeutiques de première ligne dans les pays du Sud. Cependant, malgré cette augmentation, les traitements de première ligne actuellement recommandés par l'OMS restent efficaces. Mais il sera peut être nécessaire à l'avenir d'adapter les recommandations en fonction du niveau de résistance primaire (nécessité d'un test de résistance pré-thérapeutique? IP en première ligne en l'absence de test génotypique de résistance?). Par ailleurs, l'initiation de plus en plus précoce des traitements, comme cela est recommandé par les experts est un facteur d'augmentation de la résistance primaire, il est donc absolument indispensable de poursuivre cette surveillance.

Les mutations observées dans notre évaluation sont : la mutation M184V/I associée à la résistance au 3TC/FTC; la mutation T215Y, associée aux analogues de la thymidine (TAM), comme la d4T et l'AZT, ainsi que la mutation K103N associée à la résistance aux INNTIs de première génération (la NVP et l'EFV). Nous avons aussi observé la mutation I54V associée à la résistance à certains IP. Cette mutation peut être en lien avec les molécules utilisées en 2ème ligne de traitements utilisés au Mali, à savoir l'IDV et le LPV. Toutes ces mutations mises en évidence sont en accord avec celles retrouvées dans les précédentes études réalisées en 2005 et 2006 à l'exception de la mutation I54V. En outre, dans l'étude réalisée par Haidara et al en 2009, des polymorphismes associés aux IPs ont été observés en plus de celles observées dans cette étude. Dans une cohorte africaine de patients naïfs d'ARV, Hamers et al ont retrouvé les mêmes mutations K103N (1,8%), les TAMs (1,6%) et la M184V (1,2%) comme étant les plus courantes entre 2007 et 2009 (Hamers et al. 2012). Les mutations identifiées dans notre étude sont tout à fait en accord avec l'utilisation des molécules antirétrovirales disponibles dans le pays. Il est envisageable de penser que certains patients de notre étude aient pu être surinfectés récemment par une souche portant d'autres mutations mais que notre technique standard de génotypage n'ait pas pu les détecter. En effet, le génotypage classique selon la méthode de Sanger utilisé dans ce travail n'a certainement pas pu identifier les variants minoritaires. De principe, ce type de technique ne détecte une mutation que lorsqu'elle représente au moins 15-20% de la population virale. Par ailleurs, des études ont montré que certains variants résistants minoritaires ont des implications cliniques; en particulier, les variants résistants aux INNTIs peuvent avoir un impact sur la réponse virologique à un

traitement à base d'INNTI. Actuellement, des nouvelles générations de séquençage ou NGS (Next Generation Sequencing) permettent de détecter ces variants minoritaires (1-15%), et il serait donc intéressant de réaliser des études de surveillance avec ces nouvelles technologies.

Dans deuxième partie de notre travail sur la résistance primaire, réalisée dans un contexte Européen (en France), nous avons évalué la prévalence de mutations associées à la combinaison TDF/FTC/RPV chez des patients naïfs. Dans ce travail, nous rapportons une prévalence de 4,9% de mutations de résistance associées à la RPV, INNTI de seconde génération. Cette prévalence était non significativement différente de celle associée aux INNTI de première génération dans notre population soit 3,7% et 3,8%, respectivement pour l'EFV et la NVP. La prévalence de la résistance primaire associée à la RPV était cohérente avec celle observée dans l'étude nationale française Odyssée où 2,4% des échantillons avaient au moins une mutation associée aux INNTI (Descamps et al. 2013). Nous avons expliqué plus haut, qu'une haute couverture antirétrovirale était associée à un niveau élevé de résistance primaire, cependant les prévalences faibles observées dans ce travail, comparées à celles retrouvées au Mali (un contexte du Sud), peuvent s'expliquer par l'utilisation préférentielle des IP dans les pays du Nord, en particulier en France. Ce résultat peut également être dû à un meilleur suivi virologique des patients au Nord comparé au Sud pour détecter et prendre en charge les échecs thérapeutiques de façon très précoce et donc limiter la transmission de virus résistants. Bien que, la prévalence des mutations de résistance associées à la RPV, au FTC et au TDF soit très faible dans cette étude, nous avons observés une différence significative de la prévalence des mutations associées à la RPV entre les sous-types non B (6%) *versus* B (3,7%). Les sous-types non B sont de plus en plus fréquents dans les pays Occidentaux et de nombreuses études ont montré une augmentation de la résistance primaire chez ces virus non B, alors qu'elle reste stable chez le sous-type B (Wensing et al. 2005; Descamps et al. 2010). Wainberg et al ont également rapporté que les possibilités de transmettre des souches résistantes sont plus élevées dans les pays du Sud avec les sous-types non B que dans les pays du Nord avec le sous-type B (Wainberg et al. 2011). Cela peut être dû à l'utilisation de molécules à plus faible barrière génétique en première ligne et l'absence de suivi virologique généralisé des patients traités dans les pays du Sud. Toutefois, une récente étude asiatique n'a pas trouvé de différence dans la prévalence des mutations associées à la RPV entre les sous-types non B versus B (Sungkanuparph et al. 2013), mais cette étude concernait principalement le CRF01_AE alors dans notre étude il s'agissait majoritairement de CRF02_AG. De plus, dans les essais ECHO et THRIVE, le taux d'échec virologique à l'association FTC/TDF/RPV

était similaire dans le groupe des patients infectés par un virus de sous-type B ou non-B (Rimsky et al. 2012). Néanmoins, il semble essentiel de disposer d'une définition consensuelle de la résistance primaire et de s'affranchir des biais relatifs à l'algorithme utilisé pour mieux estimer cette prévalence pour tous les sous-types.

En outre, un des défis de l'évaluation de la résistance primaire est d'identifier les personnes récemment infectées par le VIH pour une estimation réelle des profils de mutations chez ces patients. En effet, en France plus de 28000 personnes ignorent leur séropositivité (Morlat 2013) et en Afrique la grande majorité des patients est diagnostiquée à un stade très tardif, d'où la difficulté de détecter cette résistance précocement. Une alternative pratique serait d'évaluer la résistance chez les patients au moment de leur mise sous traitement, pas seulement pour la surveillance, mais en pratique courante, et cela nécessiterait un accès plus large aux tests génotypiques. De plus, le niveau de plus en plus élevé de la résistance primaire rapporté dans ce travail et dans de nombreuses autres études africaines soulève des préoccupations au sujet de l'utilisation systématique d'un INNTI et deux INTIs en première ligne en l'absence de tests de résistance. En effet, les mutations de résistance détectées peuvent compromettre l'efficacité des INTIs (AZT, d4T, 3TC, FTC) et des INNTIs (NVP et EFV), utilisés en première intention de traitement dans cette région du monde. Par ailleurs, en Afrique, et particulièrement au Mali la majorité des patients sont encore sous leur première ligne de traitement après plusieurs années. La plupart des données disponibles sur la résistance acquise sous cette première ligne concerne les échecs à court terme (12, 24 mois). Il est donc très important d'évaluer l'efficacité de cette première ligne à long terme.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à caractériser pour la première fois les profils de résistance chez des patients en échec virologique et sous traitement de première ligne depuis au moins 3 ans à Bamako, Mali. Les recommandations actuelles de l'OMS préconisent l'utilisation de 2 INTIs (dont l'un devrait être l'AZT ou TDF plus le 3TC) + 1 INNTI (EFV ou NVP) pour une première ligne de traitement ARV chez les patients avec un taux de CD4 <350 cellules /mm^3 (et/ou être au stade III ou IV) ((OMS) 2013). Les récentes données de l'ONUSIDA et de l'OMS montrent un progrès important quant à l'accès aux ARV dans les pays du Sud grâce à une approche de santé publique simplifiée. Néanmoins, de nombreux efforts restent nécessaires pour la pérennité et l'efficacité de ces traitements, d'autant plus que le suivi virologique dans ces pays reste faible,

avec en particulier un manque d'évaluation de la charge virale en routine et ainsi un risque d'échecs virologiques non contrôlés.

Les données disponibles sur l'efficacité des traitements approuvés par l'OMS dans les pays du Sud montrent des résultats contradictoires. En effet, certains résultats à court terme dans les pays africains ont été pour la plupart prometteurs, car les proportions de patients en succès après 6-24 mois de traitement de première ligne étaient comparables à ceux des pays développés (Ferradini et al. 2006; Barth et al. 2008). Toutefois, de nombreuses études montrent des taux élevés d'échecs virologiques après 12 ou 24 mois de traitement (Charpentier et al. 2012; Liegeois et al. 2012). Ainsi, plus de 70% des patients en échec sous leur première ligne ont au moins une mutation de résistance associée aux différentes molécules utilisées (Hosseinipour et al. 2009; Wallis et al. 2010). Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur les échecs virologiques chez des patients traités à long terme dans les pays du Sud. Au Mali, bien que la charge virale plasmatique soit actuellement recommandée par le programme national de lutte contre le SIDA, les ruptures de stocks de réactifs, le manque de maintenance des appareils et le peu de ressources humaines formées constituent de réels problèmes de dysfonctionnement de ces outils. Les tests de résistance sont disponibles à Bamako depuis quelques années, cependant pour des raisons de coût seuls les patients en échec virologique de deuxième ligne y ont accès. Il est important que les cliniciens et pharmaciens Maliens puissent disposer des données afin d'avoir une photographie des profils d'échappement et d'adapter au mieux le choix des molécules de seconde ligne pour les patients en échec thérapeutique de première ligne.

La majorité des mutations observées dans ce travail était les mutations M184V/I suivies par les mutations K103N et Y181C. Ces profils de mutations sont similaires aux données publiées sur l'échec de première ligne en Afrique (Hosseinipour et al. 2009; Wallis et al. 2010). Dans cette étude, comme dans de nombreuses cohortes africaines, plus de deux tiers des virus des patients en échec virologique avaient la mutation M184V, associée à un haut niveau de résistance à la 3TC et au FTC. Cette mutation augmente la sensibilité des virus avec des mutations de résistance associées au TDF (K65R) et aux analogues de la thymidine, l'AZT et la d4T (TAMs). Ceci pourrait donc retarder l'émergence des mutations associées à un haut niveau de résistance à ces molécules (Ait-Khaled et al. 2002; Boyer et al. 2002). Ces données peuvent expliquer la fréquence modérée des TAMs dans cette étude malgré une longue durée de traitement suboptimal. Dans notre population, la mutation K65R qui est sélectionnée par le TDF et moins fréquemment la d4T, était peu détectée ; probablement parce que le TDF n'est

pas très utilisé en première intention au Mali. Ce résultat peut également être dû au fait que le principal sous-type circulant, CRF02_AG pourrait ne pas sélectionner facilement cette mutation en comparaison avec le sous-type C (Brenner et al. 2006; Sunpath et al. 2012). Une revue récente portant sur l'évaluation de 4 régimes de première ligne recommandés par l'OMS chez l'adulte, a montré que seule la combinaison TDF/3TC/NVP était associée à un risque élevé d'échec avec la K65R comparée à d'autres combinaisons (Tang et al. 2012). Les auteurs soulignent l'intérêt de privilégier l'EFV à la NVP pour minimiser le risque de sélection de la mutation K65R.

Nous avons également rapporté une haute prévalence de la résistance associée aux INNTIs de première génération avec 76% et 77%, respectivement pour l'EFV et la NVP. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées en Afrique, lesquelles montrent un taux élevé de résistance aux INNTIs après l'utilisation de régimes de première ligne comme recommandé par l'OMS dans cette région. Bien que les INNTIs de deuxième génération ne soient pas utilisés au Mali, un taux de résistance de 34% et 49% a été retrouvé respectivement pour l'ETR et la RPV. Le niveau élevé de la résistance à ces molécules était principalement due à la présence de la mutation Y181C chez les patients. Wallis et al ont montré que seuls 32% des virus étaient pleinement sensibles à l'ETR et à la RPV après une moyenne de 3 ans de traitement de première ligne (Wallis et al. 2014). Certains auteurs ont mis en évidence que la NVP sélectionne les mutations Y181C et G190A, lesquelles entrainent une sensibilité réduite à l'ETR et à la RPV (Wallis et al. 2010; Tambuyzer et al. 2011; van Zyl et al. 2011;Hamers et al. 2012). Ces résultats sont en accord avec nos données, car les patients étaient plus exposés à la NVP qu'à l'EFV. Aussi, en Afrique du Sud, où l'EFV est plus utilisé seul 10% de résistance à l'ETR après échec de première ligne était observé (Stevens et al. 2009). De plus, selon Marcelin et al l'exposition antérieure à la NVP est associée à une faible réponse virologique à ETR (Marcelin et al. 2010). Tous ces résultats suggèrent, qu'il est préférable d'utiliser l'EFV plutôt que la NVP dans les régimes de première ligne afin de préserver les INNTIs de seconde génération. Ces résultats confirment également le risque d'accumulation de mutations de résistance après un échec prolongé sous INNTIs de première génération, accumulation qui compromet fortement l'utilisation l'ETR et de la RPV comme molécules de seconde ou troisième ligne en Afrique (Bunupuradah et al. 2011; Ugbena et al. 2012). D'autres mutations associées aux INNTIs ont été rapportés : V179/E/I/M/T, V90I K101E/H/R/P, G190A/S, V106A/I/M, H221Y, E138AG/K/Q, A98G, M230I/L, P225H et L100I. Très peu de patients avaient reçu des inhibiteurs de protéase comme l'IDV, les mutations de résistance associées à cette classe étaient donc rares. Cependant, la mutation

L90M a été observée chez 2% des patients ainsi que de nombreux polymorphismes associés aux IPs. Ceci supporte le choix approprié des IPs en deuxième ligne comme recommandé par l'OMS pour les pays du Sud.

Nous avons également étudié dans ce travail, les facteurs associés à la résistance aux molécules de deuxième ligne disponibles au Mali (ABC, TDF, les IP) ainsi qu'aux INNTIs de deuxième génération. Les analyses montrent que la résistance à l'ABC et au TDF était faible mais fortement associée à une haute CV, un faible taux de CD4, un faible GSS pour le traitement, au nombre de mutations associées aux INTIs et une longue durée du traitement. Toutefois, plus de 50% des patients sont restés sensibles au TDF, à la ddI et à l'ABC, lesquels sont utilisés principalement en deuxième ligne de traitement au Mali. Des résultats similaires ont été observés dans une récente étude, bien que 90% des sujets avait au moins une mutation de résistance, 57-77% des sujets était sensible au TDF et seulement 37% était sensible à la ddI(Wallis et al. 2014). Aghokeng et al. ont également rapporté la préservation des molécules de seconde ligne dans une étude sur la première ligne à 36 mois (Aghokeng et al. 2013). Ces résultats confirment donc que le TDF reste une bonne option pour le traitement de deuxième ligne. De plus, la faible résistance au TDF dans ces échecs de traitement à long terme est en faveur de l'utilisation de cette molécule en première intention comme récemment recommandé par l'OMS. Le niveau de résistance à l'ETR et la RPV était associé avec un nombre élevé de mutations associées aux INTIs et aux INNTIs. Des résultats similaires pour la résistance aux INNTIs de deuxième génération avec virémie prolongée ont été rapportés en Afrique (Bunupuradah et al. 2011). Bien que, les recommandations nationales maliennes préconisent l'utilisation de la CV en routine pour la surveillance de l'échec virologique, nos résultats montrent que les patients sont maintenus sous leurs schémas thérapeutiques malgré une CV détectable au long cours, avec comme conséquence l'accumulation de mutations de résistance, notamment les mutations liées aux INNTIs et TAMs. Ces résultats renforcent la nécessité d'un meilleur suivi virologique dans les pays du Sud. Une limite de cette étude est l'absence de données sur la résistance pré-thérapeutique dans la population étudiée. De plus, la durée de la réplication virale sous traitement n'était pas déterminée avec précision et il n'y avait pas d'informations sur l'adhérence au traitement. Néanmoins, ces limites reflètent les soins de routine dans les pays du Sud et rendent nos conclusions généralisables à d'autres pays. Il est donc indispensable d'éviter tout risque d'accumulation des mutations de résistance sous réplication virale en faisant un suivi virologique régulier. Enfin, les résultats de cette étude sont issus uniquement de la capitale où le suivi des patients semble être meilleur par

rapport aux autres zones du pays, car les outils virologiques y sont disponibles. Ainsi, il sera intéressant d'étendre ce travail aux zones rurales au Mali où se trouvent des patients avec un suivi plus aléatoire.

Ces travaux sur les résistances primaires et acquises dans cette thèse ont également permis de confirmer la grande diversité génétique du VIH-1 au Mali. Le sous-type CRF02_AG reste prédominant avec un léger déclin (66% en 2010 comparé à 72% entre 2005-2009). Ce déclin serait attribuable à une augmentation progressive de la diversité génétique, résultat de l'importation directe ou indirecte de nouveaux variants à partir des pays voisins et d'un probable mécanisme local de recombinaison génétique. Ainsi plusieurs autres sous-types tels que A1, C, D, F-2, G, CRF01_AE, CRF05_DF, CRF06_cpx, CRF09_cpx, CRF1501_B, CRF30_0206, CRF45_cpx et de nombreux sous-types non identifiés ou URF (environ 12%) sont rapportés. Les activités de commerce transfrontalières semblent être des facteurs d'introduction de nouveaux variants VIH-1 au Mali. De plus, Peeters et al. ont montré que seulement un tiers des professionnelles de sexe dans ce pays était de nationalité malienne, la prévalence du VIH est la plus élevée dans ce groupe de personnes à risque (Peeters et al. 1998). Nous avons aussi observé des gènes *pol* très mosaïques chez les différents URF, impliquant les sous types CRF01_AE et A1 dans la plupart des cas. Toutefois, dans nos études sur la résistance, nous n'avons pas pu mettre en évidence un lien entre ces différents sous-types non B et les profils des mutations. Cela pourrait s'expliquer par le nombre limité des autres sous-types non B comparé au CRF02_AG et les tailles de nos échantillons dans ces études.

La troisième partie de cette thèse a porté sur l'étude du mécanisme d'acquisition de la résistance aux nouvelles molécules pour différents sous-types. En effet, nous avons étudié la barrière génétique à la résistance aux nouvelles molécules antirétrovirales vis-à-vis des VIH-1 de sous-types non B par rapport au sous-type B. Dans un premier temps, nous avons étudié la barrière génétique à la résistance aux INNTIs de seconde génération (ETR et RPV) entre les sous-types B et CRF02_AG, puis nous avons exploré celle du nouvel inhibiteur d'attachement, BMS-626529 entre plusieurs sous-types non B et le sous-type B. Ces molécules comme les premiers ARV ont été mis au point sur la base du VIH-1 de sous-type B. Bien qu'elles aient montré une activité sur la plupart des sous-types non B, très peu de données sont disponibles en ce qui concerne leur capacité à acquérir plus ou moins rapidement des mutations de résistance en fonction des différents sous-types. Ainsi, nos

travaux ont porté sur les polymorphismes nucléotidiques au niveau de la TI et de l'enveloppe virale. Le changement d'acides aminés qui induit des mutations de résistance peut nécessiter très souvent un seul changement nucléotidique (1 transition) ou (1 transversion) ou même les 2 à la fois, nous permettant ainsi de calculer le score de la barrière génétique.

Nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur les différents codons impliqués dans la résistance du VIH-1 à l'ETR et à la RPV, de façon à comparer la barrière génétique pour le sous-type B qui prédomine en France et pour le CRF02_AG, majoritaire en Afrique de l'Ouest et de plus en plus fréquent en France. L'ETR et la RPV sont des molécules avec une activité sur des souches résistantes à la première génération des INNTIs, lesquels sont largement utilisés en Afrique. Nos résultats montrent qu'une majorité des codons étudiés (7/12) sont conservés entre les deux sous-types, et plus particulièrement, les mutations majeures impliquées dans la résistance à ces molécules. Au niveau des 5 autres positions (90, 98, 179, 181 et 227) étudiées, des différences de codons prédominants étaient observées entre les 2 sous-types avec un effet sur la barrière génétique uniquement au codon 179 (avec un score de 2.5 *versus* 3.5 pour V179D et un score de 2.5 *versus* 5 pour V179F respectivement pour le sous-type B *versus* le sous-type CRF02_AG). Les polymorphismes identifiés au niveau des codons impliqués dans la résistance à la RPV (179, 181 et 221) n'influençaient pas la barrière génétique à la résistance entre les sous-types B et CRF02_AG. Cependant, les mutations V179D et V179F diminuent la sensibilité *in vitro* à l'ETR (Asahchop et al. 2011) et elles ont été sélectionnées *in vivo* lors d'échecs à l'ETR (Madruga et al. 2007; Marcelin et al. 2012). Des études précédentes comparant la barrière génétique entre différents sous-types du VIH-1 vis-à-vis des INTIs, INNTIs de première génération, INI et IP montrent que celle-ci est très proche entre les sous-types non-B et B, au niveau des mutations majeures impliquées dans la résistance (van de Vijver et al. 2006; Maiga et al. 2009; Nguyen et al. 2012). Cependant, les sous-types non B montrent parfois une barrière genetique plus élevée comparé au sous-type B à certaines positions secondaires, comme dans le travail présenté ici. Par exemple, les virus CRF02_AG présentent une barrière génétique plus élevée pour la mutation de résistance secondaire G140S associées aux INI que le virus sous-type B (Maiga et al. 2009).

Les inhibiteurs d'attachement représentent une nouvelle classe d'inhibiteur d'entrée dans la thérapie antirétrovirale du VIH-1. Ils agissent en bloquant la liaison entre le récepteur CD4 et la gp120 du virus. Les protéines gp120 et gp41 codées par le gène de l'enveloppe présentent une grande variabilité entre les sous-types pouvant atteindre 35% (Gaschen et al. 2002). Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude de la barrière génétique de l'inhibiteur d'attachement BMS-626529 entre différents sous-types du VIH-1. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au sous-type B majoritaire en France et à différents sous-types non-B (C, D, CRF02_AG et CRF01_AE). Le sous-type C, représente à lui seul près de 50% des infections mondiales, tandis que les CRF02_AG et CRF01_AE sont respectivement les sous-types les plus prévalent en Afrique de l'Ouest et en Asie. Quant au sous-type D, il est plus prévalent en Afrique de l'Est et semble avoir des propriétés particulières en ce qui concerne l'évolution rapide de la maladie. Tous ces virus non B sont également de plus en plus retrouvés en Europe. L'objectif de ce travail était de savoir si la grande variabilité de l'enveloppe du VIH-1 avait un impact sur la barrière génétique entre les différents sous-types. Nous avons exploré les codons de 300 séquences du gène *env* (gp120) provenant de patients naïfs d'ARVs. Neuf substitutions associées à la résistance au BMS-626529 correspondant à sept positions d'acides aminés (116, 204, 375, 426, 434, 475 et 506) ont été étudiées et comparés entre le sous-type B et les autres sous-types (C, D, CRF02_AG et CRF01_AE) pour le calcul de la barrière génétique. La majorité des positions étudiées 116, 426, 434, 475 et 506 est assez bien conservée au niveau acide aminé entre les cinq sous-types, conduisant à une barrière génétique similaire pour le BMS-626529. En revanche, concernant les acides aminés aux positions 116 et 506 une minorité de sous-type CRF02_AG et de sous-type C ont montré une barrière génétique plus élevée par rapport aux autres sous-types, suggérant plus de difficultés pour ces sous-types à acquérir des mutations de résistance à ces positions. Cependant, pour la position 375, quelques séquences de sous-type CRF02_AG ont montré une plus faible barrière génétique pour les mutations S375M/T dans notre étude. Cette position a été identifiée comme étant impliquée dans la résistance naturelle du sous-type CRF01_AE et du VIH-2 au BMS-626529 (Li et al. 2013). Par ailleurs, au niveau des positions 204 et 375, différents codons prédominant étaient observés chez différents sous-types, mais n'ayant pas d'effet sur la barrière génétique.

La résistance primaire au BMS-626529 a été observée au niveau de 4 positions (375, 426, 434 et 475) du gène de la gp120, plus particulièrement, pour les sous-types CRF01_AE, CRF02_AG, C et D. Ces résultats confirment que certaines mutations de résistance décrites et

associées au BMS-626529 peuvent exister naturellement dans certaines séquences de virus de patients naïfs de traitement (Charpentier et al. 2012; Soulie et al. 2013). La présence naturelle de mutations polymorphiques associées à la résistance au BMS-626529 chez certains sous-types non B pourrait favoriser son échappement lors de la pression sélective ou la non réponse à la molécule. Cependant, bien que l'enveloppe du VIH-1 soit très variable, la barrière génétique pour les mutations de résistance associées à l'inhibiteur d'attachement BMS-626529 est similaire pour la plupart des sous-types étudiés (B, C, D, CRF02_AG et CRF01_AE). Ces résultats pourraient être liés à la localisation de la plupart des mutations de résistance associées aux inhibiteurs d'attachement dans la région conservée (C1, C2, C3 et C4) de l'enveloppe du VIH-1 (Zhou et al. 2014). Il se pourrait également que la liaison entre le CD4 et la gp120 soit indépendante du sous-type viral. Des études génétiques seront sans doute nécessaires afin d'étudier le polymorphisme génétique de la molécule CD4 des personnes infectées par différents sous-types viraux du VIH. Il sera également nécessaire d'étudier les différents profils de résistance sélectionnés par différents sous-types, ainsi que les fréquences d'échappement chez les patients traités.

En conclusion, en dépit du fait que tous les ARV soient développés sur le sous-type B par les laboratoires pharmaceutiques, le comportement des sous-types non B du VIH-1 est très proche de celui du sous-type B en ce qui concerne la sensibilité naturelle aux ARVs, à quelques exceptions près (CRF01_AE naturellement résistant au BMS-626529 par exemple). En ce qui concerne l'acquisition de la résistance, des profils particuliers peuvent être sélectionnés préférentiellement par certains sous-types (comme la V106M et K65R par le sous-type C) avec les molécules disponibles actuellement. Cependant, il est important de poursuivre ces travaux sur les nouvelles molécules, en particulier sur la classe des inhibiteurs de l'intégrase et sur le sous-type C qui est le plus prévalent des sous-types non B. En effet, cette classe va être de plus en plus utilisée et des premiers résultats ont montré qu'il existait des différences de barrière génétique pour la résistance au RAL, certains profils de mutations plus délétères pour les traitements de relais par le DTG pouvant être plus facilement sélectionnées par certains sous-types.

Dans l'étude de la résistance primaire, nos résultats montrent une augmentation de la prévalence par rapport aux années précédentes, signe que la transmission de souches résistantes prend de l'ampleur au Mali. Des données récentes confirment que cette augmentation est générale en Afrique. Il est donc important de surveiller annuellement la prévalence de la transmission de souches résistantes, mais également d'identifier les

nouveaux sous-types pouvant apparaître et circuler dans les pays du Sud.

Enfin, l'étude de la résistance acquise après 3 ans de traitement montre que des patients en échec virologique à une 1ère ligne contenant AZT/d4T + 3TC + NVP/EFV développent la plupart du temps des mutations de résistance au 3TC (M184V) ainsi que certaines TAMs. De plus, un haut niveau de résistance aux INNTIs (Y181C et K103N principalement), compromettant l'utilisation de la seconde génération de cette classe pour le traitement de 2ème ligne a été observé.

Ces résultats montrent que, si le suivi biologique n'est pas réalisé suffisamment tôt et régulièrement chez un patient sous traitement antirétroviral, le risque de sélection et d'accumulation de mutations de résistance sera important, limitant ainsi le choix des options thérapeutiques ultérieures, choix déjà restreint dans les pays du Sud. Les programmes de lutte contre le SDA doivent veiller à ce qu'il existe un accès au suivi afin de protéger les traitements déjà disponibles mais également de préserver les molécules ultérieures. Une des priorités les plus urgentes est de fournir au nombre croissant de personnes en échec sous ARV, l'accès à un traitement optimal, y compris les traitements basés sur des nouvelles molécules comme les INNTI, les IP/r et les INI de nouvelles générations. Il est absolument nécessaire que les pays du Sud bénéficient d'un accès élargi aux nouvelles molécules ARV, particulièrement celles avec une barrière génétique élevée comme le dolutegravir et le darunavir. Actuellement, plusieurs essais thérapeutiques sont en cours dans les pays du Sud afin d'évaluer des stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients en échec. Ainsi l'étude pilote Thilao (THIrd Line Antiretroviral Optimization) vise à évaluer la prise en charge des échecs de deuxième ligne et le passage à la troisième ligne dans plusieurs pays d'Afrique (Burkina-Faso, Côte d'Ivoire, Cameroun, Mali, Sénégal). Les résultats de cette étude constitueraient sans doute un outil de plaidoyer pour plus d'accès aux ARV dans ces pays. D'autres essais multicentriques comme les essais 2-Lady ANRS 12 169 et MOBIDIP ANRS 12 286 « Mono ou Bithérapie d'Inhibiteur de la Protéase » évaluent des stratégies de traitement sous deuxième ligne d'ARV en Afrique subsaharienne.

De plus, l'accessibilité aux outils virologiques (charge virale et tests de résistance doit être une priorité. Ceci est essentiel pour le maintien du bénéfice des traitements, ainsi que pour la prévention de la résistance primaire et acquise. Aussi, ces résultats impliquent de poursuivre la surveillance épidémiologique de la résistance primaire et acquise, ainsi que l'étude des mécanismes d'acquisition de la résistance. Enfin, les pays devraient élaborer des plans d'investissement nationaux et prendre des mesures pour améliorer la durabilité, l'efficacité et l'efficience des services liés à l'organisation des systèmes de santé et la prise en charge des

personnes infectées par le VIH en particulier. De plus, cela permettra d'améliorer l'observance ainsi que le maintien des patients dans les services de soin à travers des stratégies d'éducation thérapeutique afin de limiter l'émergence rapide de la résistance. Toutes ces mesures sont capitales, car l'objectif ZERO infection à VIH de l'Onusida en dépend fortement.

REFERENCES

(OMS), O. M. d. l. S. (2012). "WHO HIV drug resistance report 2012." http://www.who.int.

(OMS), O. M. d. l. S. (2013). "Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for public health approch. Genève, ." WHO-World Health Organization), 2013.

(UNAIDS), O. (2013). "Rapport sur l'épidemie mondiale de SIDA. Programme commun des nations unis sur le VIH/SIDA, 2013." Disponible sur le site internet : htpp/www.unaids.org.

Abegaz, W. E., et al. (2008). "Threshold survey evaluating transmitted HIV drug resistance among public antenatal clinic clients in Addis Ababa, Ethiopia." Antivir Ther**13 Suppl 2**: 89-94.

Aghokeng, A. F., et al. (2013). "Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon." J Int AIDS Soc**16**: 18004.

Aghokeng, A. F., et al. (2011). "Scale-up of antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa is accompanied by increasing HIV-1 drug resistance mutations in drug-naive patients." AIDS**25**(17): 2183-2188.

Ait-Khaled, M., et al. (2002). "M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine." AIDS**16**(12): 1686-1689.

Arion, D., et al. (1998). "Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase." Biochemistry**37**(45): 15908-15917.

Ariyoshi, K., et al. (2003). "Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection." J Acquir Immune Defic Syndr**33**(3): 336-342.

Asahchop, E. L., et al. (2011). "Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes." Antimicrob Agents Chemother**55**(2): 600-607.

Atlas, A., et al. (2005). "Impact of HIV type 1 genetic subtype on the outcome of antiretroviral therapy." AIDS Res Hum Retroviruses**21**(3): 221-227.

Baba, M., et al. (2007). "Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652." Antimicrob Agents Chemother**51**(2): 707-715.

Barre-Sinoussi, F., et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science**220**(4599): 868-871.

Barth, R. E., et al. (2008). "Effectiveness of highly active antiretroviral therapy administered by general practitioners in rural South Africa." Eur J Clin Microbiol Infect Dis**27**(10): 977-984.

Baxter, J. D., et al. (2000). "A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Beirn Community Programs for Clinical Research on AIDS." AIDS**14**(9): F83-93.

Bennett, D. E., et al. (2008). "Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment." Antivir Ther**13 Suppl 2**: 25-36.

Boyer, P. L., et al. (2001). "Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase." J Virol**75**(10): 4832-4842.

Boyer, P. L., et al. (2002). "The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1." J Virol**76**(7): 3248-3256.

Brenner, B. G., et al. (2006). "HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture." AIDS**20**(9): F9-13.

Bunupuradah, T., et al. (2011). "Etravirine and rilpivirine resistance in HIV-1 subtype CRF01_AE-infected adults failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens." Antivir Ther**16**(7): 1113-1121.

Campbell, T. B., et al. (2005). "Antiviral activity of lamivudine in salvage therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection." Clin Infect Dis**41**(2): 236-242.

Castagna, A., et al. (2006). "Lamivudine monotherapy in HIV-1-infected patients harbouring a lamivudine-resistant virus: a randomized pilot study (E-184V study)." AIDS**20**(6): 795-803.

Castagna, A., et al. (2014). "Dolutegravir in Antiretroviral-Experienced Patients With Raltegravir- and/or Elvitegravir-Resistant HIV-1: 24-Week Results of the Phase III VIKING-3 Study." J Infect Dis**210**(3): 354-362.

Charpentier, C., et al. (2012). "Virological response and resistance profiles after 18 to 30 months of first- or second-/third-line antiretroviral treatment: a cross-sectional evaluation in HIV type 1-infected children living in the Central African Republic." AIDS Res Hum Retroviruses**28**(1): 87-94.

Charpentier, C., et al. (2012). "Prevalence of subtype-related polymorphisms associated with in vitro resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in HIV-1 'non-B'-infected patients." J Antimicrob Chemother**67**(6): 1459-1461.

Cingolani, A., et al. (2002). "Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA)." AIDS**16**(3): 369-379.

Clavel, F., et al. (1989). "Genetic recombination of human immunodeficiency virus." J Virol**63**(3): 1455-1459.

Clumeck, N., et al. (2014). "A randomized, double-blind comparison of single-tablet regimen elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir DF vs ritonavir-boosted atazanavir plus emtricitabine/tenofovir DF for initial treatment of HIV-1 infection: analysis of week 144 results." J Acquir Immune Defic Syndr**65**(3): e121-124.

Coffin, J. M. (1995). "HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy." Science**267**(5197): 483-489.

Cohen, C. J., et al. (2011). "Rilpivirine versus efavirenz with two background nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors in treatment-naive adults infected with HIV-1 (THRIVE): a phase 3, randomised, non-inferiority trial." Lancet**378**(9787): 229-237.

De Wit, S., et al. (2004). "Viral load and CD4 cell response to protease inhibitor-containing regimens in subtype B versus non-B treatment-naive HIV-1 patients." AIDS**18**(17): 2330-2331.

Delaugerre, C. (2010). "[Genetic barrier to antiretroviral drug-resistance. Focus on raltegravir, the first integrase inhibitor]." Med Mal Infect**40 Suppl 1**: S1-10.

Delelis, O., et al. (2009). "The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation." Nucleic Acids Res**37**(4): 1193-1201.

Derache, A., et al. (2008). "Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006." J Antimicrob Chemother**62**(3): 456-463.

Descamps, D., et al. (2013). "National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-2011." Journal of Antimicrobial Chemotherapy**68**(11): 2626-2631.

Descamps, D., et al. (2010). "Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France." J Antimicrob Chemother**65**(12): 2620-2627.

Diallo, K., et al. (2003). "Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother**47**(11): 3377-3383.

Doranz, B. J., et al. (1997). "Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1." J Virol**71**(9): 6305-6314.

EDSM-IV (2006). "Enquête Démographique et de Santé du MALI, Complement." Cellule de Planification et de Statistiques (CPS), Institut National de la Statistique (INSTAT), Ministère de la Santé du Mali.

EDSM-V (2013). "Enquête Démographique et de Santé du MALI." Cellule de Planification et de Statistiques (CPS), Institut National de la Statistique (INSTAT), Ministère de la Santé du Mali.

Eron, J. J., et al. (1995). "Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party." N Engl J Med**333**(25): 1662-1669.

Ferradini, L., et al. (2006). "Scaling up of highly active antiretroviral therapy in a rural district of Malawi: an effectiveness assessment." Lancet**367**(9519): 1335-1342.

Flandre, P., et al. (2007). "Phenotypic susceptibility to didanosine is associated with antiviral activity in treatment-experienced patients with HIV-1 infection." J Infect Dis**195**(3): 392-398.

Frentz, D., et al. (2012). "Temporal changes in the epidemiology of transmission of drug-resistant HIV-1 across the world." AIDS Rev**14**(1): 17-27.

Furman, P. A., et al. (1986). "Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase." Proc Natl Acad Sci U S A**83**(21): 8333-8337.

Gaschen, B., et al. (2002). "Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection." Science**296**(5577): 2354-2360.

Gazzola, L., et al. (2009). "The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options." Clin Infect Dis**48**(3): 328-337.

Gupta, R. K., et al. (2012). "Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis." Lancet**380**(9849): 1250-1258.

Haidara, A., et al. (2010). "High level of primary drug resistance in Mali." HIV Med**11**(6): 404-411.

Hamers, R. L., et al. (2012). "Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-Saharan African countries: implications for second-line ART strategies." Clin Infect Dis**54**(11): 1660-1669.

Han, Y., et al. (2007). "Experimental approaches to the study of HIV-1 latency." Nat Rev Microbiol **5**(2): 95-106.

Hemelaar, J. (2012). "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic." Trends Mol Med**18**(3): 182-192.

Hertogs, K., et al. (1998). "A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human

immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs." Antimicrob Agents Chemother**42**(2): 269-276.
Ho, H. T., et al. (2006). "Envelope conformational changes induced by human immunodeficiency virus type 1 attachment inhibitors prevent CD4 binding and downstream entry events." J Virol**80**(8): 4017-4025.
Holguin, A. and V. Soriano (2002). "Resistance to antiretroviral agents in individuals with HIV-1 non-B subtypes." HIV Clin Trials**3**(5): 403-411.
Hosseinipour, M. C., et al. (2009). "The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy." AIDS**23**(9): 1127-1134.
Hunt, G. M., et al. (2012). "Surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance in Gauteng and KwaZulu-Natal Provinces, South Africa, 2005-2009." Clin Infect Dis**54 Suppl 4**: S334-338.
Johnson, V. A., et al. (2008). "Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Spring 2008." Top HIV Med**16**(1): 62-68.
Joly, V., et al. (2004). "Evolution of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) resistance mutations in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in HIV-1-infected patients switched to antiretroviral therapy without NNRTIs." Antimicrob Agents Chemother**48**(1): 172-175.
Kamoto, K. and J. Aberle-Grasse (2008). "Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi." Antivir Ther**13 Suppl 2**: 83-87.
Kantor, R., et al. (2005). "Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration." PLoS Med**2**(4): e112.
Kantor, R., et al. (2004). "Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy." AIDS**18**(11): 1503-1511.
Kempf, D. J., et al. (1997). "Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir." Antimicrob Agents Chemother**41**(3): 654-660.
Klatzmann, D., et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature**312**(5996): 767-768.
Kulkarni, R., et al. (2012). "The HIV-1 reverse transcriptase M184I mutation enhances the E138K-associated resistance to rilpivirine and decreases viral fitness." J Acquir Immune Defic Syndr**59**(1): 47-54.
Lessells, R. J., et al. (2013). "Implementing HIV-1 genotypic resistance testing in antiretroviral therapy programs in Africa: needs, opportunities, and challenges." AIDS Rev**15**(4): 221-229.
Li, Z., et al. (2013). "Activity of the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068, against CD4-independent viruses and HIV-1 envelopes resistant to other entry inhibitors." Antimicrob Agents Chemother**57**(9): 4172-4180.
Liegeois, F., et al. (2012). "Virological failure rates and HIV-1 drug resistance patterns in patients on first-line antiretroviral treatment in semirural and rural Gabon." J Int AIDS Soc**15**(2): 17985.
Madruga, J. V., et al. (2007). "Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet**370**(9581): 29-38.
Mahalingam, B., et al. (1999). "Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease." Eur J Biochem**263**(1): 238-245.

Maiga, A. I., et al. (2009). "Genetic barriers for integrase inhibitor drug resistance in HIV type-1 B and CRF02_AG subtypes." Antivir Ther**14**(1): 123-129.
Marcelin, A. G., et al. (2004). "Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure." J Med Virol**72**(1): 162-165.
Marcelin, A. G., et al. (2012). "Emerging mutations and associated factors in patients displaying treatment failure on an etravirine-containing regimen." Antivir Ther**17**(1): 119-123.
Marcelin, A. G., et al. (2010). "Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected patients." Antimicrob Agents Chemother**54**(1): 72-77.
Marcelin, A. G., et al. (2005). "Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine." Antimicrob Agents Chemother**49**(5): 1739-1744.
Martinez-Cajas, J. L., et al. (2009). "Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008)." J Int AIDS Soc**12**: 11.
Masquelier, B., et al. (2004). "Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients." Antivir Ther**9**(3): 315-323.
Meloni, S. T., et al. (2004). "Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3." J Virol**78**(22): 12438-12445.
Messiaen, P., et al (2013). "Clinical use of HIV integrase inhibitors: a systematic review and meta-analysis." PLoS One **8**(1): e52562.
Meyer, P. R., et al. (1999). "A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase." Mol Cell**4**(1): 35-43.
Meyer, P. R., et al. (1998). "Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A**95**(23): 13471-13476.
Miller, V., et al. (2000). "HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy." AIDS**14**(2): 163-171.
Molina, J. M., et al. (2011). "Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial." Lancet**378**(9787): 238-246.
Moncunill, G., et al. (2008). "HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro." AIDS**22**(1): 23-31.
Morlat, R. (2013). "Prise en charge Médicale des Personnes Vivant avec le VIH. Recommandations du groupe d'experts. ."
Mouroux, M., et al. (2001). "Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy." Antivir Ther**6**(3): 179-183.
Moutouh, L., et al. (1996). "Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure." Proc Natl Acad Sci U S A**93**(12): 6106-6111.
Naeger, L. K., et al. (2002). "ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother**46**(7): 2179-2184.

Ndembi, N., et al. (2011). "Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala." AIDS**25**(7): 905-910.
Nguyen, H. L., et al. (2012). "Genetic Barrier to the Development of Resistance to Integrase Inhibitors in HIV-1 Subtypes CRF01_AE and B." Intervirology**55**(4): 287-295.
Nijhuis, M., et al. (2001). "Implications of antiretroviral resistance on viral fitness." Curr Opin Infect Dis**14**(1): 23-28.
Oliveira, M., et al. (2014). "Resistance mutations against dolutegravir in HIV integrase impair the emergence of resistance against reverse transcriptase inhibitors." AIDS**28**(6): 813-819.
Peeters, M., et al. (2010). "Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays." Clin Microbiol Infect**16**(10): 1525-1531.
Peeters, M., et al. (2013). "The origin and molecular epidemiology of HIV." Expert Rev Anti Infect Ther**11**(9): 885-896.
Peeters, M., et al. (1998). "Genetic subtypes of HIV type 1 and HIV type 2 strains in commercial sex workers from Bamako, Mali." AIDS Res Hum Retroviruses**14**(1): 51-58.
Perno, C. F., et al. (2004). "Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed." J Infect Dis**189**(11): 1983-1987.
Pillay, V., et al. (2008). "Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naive HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004." Antivir Ther**13 Suppl 2**: 101-107.
Plantier, J. C., et al. (2009). "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas." Nat Med**15**(8): 871-872.
Poveda, E., et al. (2004). "Evolution of genotypic and phenotypic resistance to Enfuvirtide in HIV-infected patients experiencing prolonged virologic failure." J Med Virol**74**(1): 21-28.
Pujades-Rodriguez, M., et al. (2008). "Second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings: the experience of Medecins Sans Frontieres." AIDS**22**(11): 1305-1312.
Reigadas, S., et al. (2010). "The HIV-1 integrase mutations Y143C/R are an alternative pathway for resistance to Raltegravir and impact the enzyme functions." PLoS One**5**(4): e10311.
Rimsky, L., et al. (2012). "Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis." J Acquir Immune Defic Syndr**59**(1): 39-46.
Robertson, D. L., et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." Science**288**(5463): 55-56.
Shafer, R. W. (2002). "Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance." Clin Microbiol Rev**15**(2): 247-277.
Shehu-Xhilaga, M., et al. (2005). "Antiretroviral compounds: mechanisms underlying failure of HAART to eradicate HIV-1." Curr Med Chem**12**(15): 1705-1719.
Sigal, A., et al. (2011). "Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy." Nature**477**(7362): 95-98.
Sigaloff, K. C., et al. (2012). "Short communication: High prevalence of transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV type 1 diagnosed adults in Mombasa, Kenya." AIDS Res Hum Retroviruses**28**(9): 1033-1037.
Somda, A., et al. (2012). "Surveillance of transmitted drug-resistant HIV among young pregnant women in Ouagadougou, Burkina Faso." Clin Infect Dis**54 Suppl 4**: S317-319.

Somi, G. R., et al. (2008). "Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania." Antivir Ther**13 Suppl 2**: 77-82.

Soulie, C., et al. (2013). "Frequency of amino acid changes associated with resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in R5- and X4-tropic HIV-1 subtype B." J Antimicrob Chemother**68**(6): 1243-1245.

Stevens, W. S., et al. (2009). "Will etravirine work in patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based treatment in southern Africa?" J Acquir Immune Defic Syndr**52**(5): 655-656.

Sungkanuparph, S., et al. (2013). "Rilpivirine Resistance-Associated Mutations Among Antiretroviral-Naive Patients Infected With HIV-1 in Asia." Jaids-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**62**(3): E98-E100.

Sunpath, H., et al. (2012). "High rate of K65R for antiretroviral therapy-naive patients with subtype C HIV infection failing a tenofovir-containing first-line regimen." AIDS**26**(13): 1679-1684.

Tambuyzer, L., et al. (2011). "Effect of Mutations at Position E138 in HIV-1 Reverse Transcriptase on Phenotypic Susceptibility and Virologic Response to Etravirine." Jaids-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**58**(1): 18-22.

Tang, M. W., et al. (2012). "A review of the virological efficacy of the 4 World Health Organization-recommended tenofovir-containing regimens for initial HIV therapy." Clin Infect Dis**54**(6): 862-875.

Taylor, B. S. and S. M. Hammer (2008). "The challenge of HIV-1 subtype diversity." N Engl J Med**359**(18): 1965-1966.

Toni, T., et al. (2007). "HIV-1 antiretroviral drug resistance in recently infected patients in Abidjan, Cote d'Ivoire: A 4-year survey, 2002-2006." AIDS Res Hum Retroviruses**23**(9): 1155-1160.

Trottier B MN, L. D., Dion H, Vézina S, Lavoie S, Murphy D, Nguyen VK, Thomas R. (2011). "Removing an Inactive NRTI from an Effective Salvage Regimen is Safe, Maintains Virologic Suppression and Reduces Cost of Treatment: Week 24 Results from the VERITAS trial (TMC 114 HIV 4054)." 13th European AIDS Conference Belgrade, Serbia Oct 12-15, 2011.

Ugbena, R., et al. (2012). "Virological response and HIV drug resistance 12 months after antiretroviral therapy initiation at 2 clinics in Nigeria." Clin Infect Dis**54 Suppl 4**: S375-380.

van de Vijver, D. A., et al. (2006). "The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes." J Acquir Immune Defic Syndr**41**(3): 352-360.

van Zyl, G. U., et al. (2011). "Antiretroviral Resistance Patterns and Factors Associated With Resistance in Adult Patients Failing NNRTI-Based Regimens in the Western Cape, South Africa." J Med Virol**83**(10): 1764-1769.

Wainberg, M. A., et al. (2011). "Development of antiretroviral drug resistance." N Engl J Med**365**(7): 637-646.

Wallis, C. L., et al. (2014). "Drug Susceptibility and Resistance Mutations After First-Line Failure in Resource Limited Settings." Clin Infect Dis.

Wallis, C. L., et al. (2010). "Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa." J Acquir Immune Defic Syndr**53**(4): 480-484.

Weber, J., et al. (2003). "Role of Baseline pol Genotype in HIV-1 Fitness Evolution." J Acquir Immune Defic Syndr**33**(4): 448-460.

Wensing, A. M., et al. (2005). "Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management." J Infect Dis**192**(6): 958-966.

Whitcomb, J. M., et al. (2003). "Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates." J Infect Dis**188**(7): 992-1000.

Yeni, P. (2010). "Prise en charge Médicales des personnes vivants avec VIH. Recommandations du groupe d'experts, rapport 2010." Paris: La Documentation Française, 2010**htpp://www.sante.gouv.fr**.

Zhou, N., et al. (2014). "Genotypic correlates of susceptibility to HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active agent of the prodrug BMS-663068." J Antimicrob Chemother**69**(3): 573-581.

ANNEXES

ARTICLE 1.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 2013

Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in Newly HIV-Infected and Untreated Patients in Ségou and Bamako, Mali

Amoustapha Issiaka Maiga, **Djeneba Bocar Fofana**, Aichatou Chehy Maiga, Fodie Diallo, Zaina Ait-Arkoub, Fatoumata Daou, Mamadou Cissé, Yaya dit Sadio Sarro, Aboubacar Alassane Oumar, Aliou Sylla, Christine Katlama, BabafemiTaiwo, Robert Murphy, Anatole Tounkara, Anne-Geneviève

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 29, Number 1, 2013
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2012.0118

Transmitted Antiretroviral Drug Resistance in Newly HIV-Infected and Untreated Patients in Ségou and Bamako, Mali

Almoustapha Issiaka Maiga,[1] Djeneba Bocar Fofana,[1,2] Aichatou Chehy Maiga,[1] Fodie Diallo,[3] Zaina Ait-Arkoub,[1,2] Fatoumata Daou,[1] Mamadou Cisse,[3] Yaya dit Sadio Sarro,[1] Aboubacar Alassane Oumar,[1] Aliou Sylla,[4] Christine Katlama,[5] Babafemi Taiwo,[6] Robert Murphy,[6] Anatole Tounkara,[1] Anne-Genevieve Marcelin,[2] and Vincent Calvez[2]

Abstract

The WHO recommends regular surveillance for transmitted antiretroviral drug-resistant viruses in HIV antiretroviral treatment (ART)-naive patients in resource-limited settings. This study aimed to assess the prevalence of mutations associated with resistance in ART-naive patients newly diagnosed with HIV in Bamako and Ségou in Mali. HIV-positive patients who never received ART were recruited in Bamako and Ségou, Mali. The reverse transcriptase (RT) and protease (PR) genes of these patients were sequenced by the "ViroSeq" method. Analysis and interpretation of the resistance were made according to the WHO 2009 list of drug resistance mutations. In all, 51/54 (94.4%) sample patients were sequenced. The median age (IQR) of our patients was 24 (22–27) years and the median CD4 count was 380 (340–456) cells/mm^3. The predominant subtype was recombinant HIV-1 CRF02_AG (66.7%) followed by CRF06_cpx (12%) and CRF09_cpx (4%). Four patients had mutations associated with resistance, giving an overall prevalence of resistance estimated at 7.9%. There were two (4%) patients with nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) mutations (one M184V and one T215Y), two (4%) with non-NRTI mutations (two K103N), and one (2%) with a protease inhibitor mutation (one I54V). The prevalence of primary resistance in newly infected patients in Mali is moderate (7.9%). This indicates that the standard NNRTI-based first-line regimen used in Mali is suboptimal for some patients. This study should be done regularly to inform clinical practice.

Introduction

The HIV prevalence in Mali was 1.6 and 1.3% in 2003 and 2006, respectively.[1] In low and middle-income countries (LMIC), only a few people had access to antiretroviral (ARV) drugs until the past few years. The introduction of generic fixed dose drugs (like Triomune, which is largely used in Mali) and other affordable ARV combinations through local and international efforts has led to a significant increase in the number of ARV-treated patients. The most dramatic increase in antiretroviral therapy coverage occurred in sub-Saharan Africa, approximately a 20% increase between 2009 and 2010 alone. In LMIC, 47% of the 14.2 million treatment eligible people living with HIV were on antiretroviral therapy at the end of 2010, compared to 39% at the end of 2009 (World AIDS Day Report 2011).

HIV treatment started in Mali in 1997 with few patients, but by the end of 2011 more than 35,000 patients were on treatment. Many studies performed in LMIC showed that patients who failed first-line and second-line regimen harbored considerable resistance mutations, especially the thymidine analog mutations (TAMs). A recent study from second-line failure patients in Mali showed that 8/94 (8.6%) harbored multiresistant virus to all drugs available in Mali.[2] Those patients can infect new patients with virus harboring drug resistance mutations.

[1]Unite d'Epidemiologie Moleculaire de la Resistance du VIH aux ARV, SEREFO, FMPOS, Universite des Sciences Techniques et des Technologies de Bamako, USTTB, Bamako, Mali.
[2]Department of Virology, Inserm U943, Pitie-Salpetriere Hospital, Paris, France.
[3]ARCAC-SIDA-CESAC, Bamako, Mali.
[4]Cellule Sectorielle de Lutte contre le Sida, Ministere de la Sante, Bamako, Mali.
[5]Department of Infectious Diseases, Inserm U943, Pitie-Salpetriere Hospital, Paris, France.
[6]Northwestern University, Division of Infectious Diseases, Chicago, Illinois.

The World Health Organization (WHO) recommends HIV drug resistance surveillance among ARV-naive patients for all countries involved in ARV access programs. Previous studies reporting on ARV primary resistance from chronically infected, ARV-naive patients in Burkina Faso,[3] Côte d'Ivoire,[4,5] Mali,[6–8] Mozambique,[9] Uganda,[10] Rwanda,[11] and Zambia[12] showed a low prevalence of ARV drug resistance, about or below 5%. Recent data published form Niger and Guinea-Conakry showed that the prevalence of transmitted virus with resistance mutation was higher: 6% in Niger and 9% in Guinea Conakry.[13] In 2008, a study in Mali showed a prevalence of 2.5% and 1% for nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) resistance mutations, respectively.[6] No protease inhibitor (PI) resistance mutation was found. The last survey was done in 2009 and reported a primary resistance prevalence of 9.9%, but that study considered many minor resistance mutations.[8] The aim of the current study was to assess the prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-1 from recently diagnosed and untreated patients living in Bamako and Ségou, Mali, 13 years after ARV introduction in the country.

Materials and Methods

The study was performed in two districts in Mali, Bamako and Ségou, using the same survey method in both sites. According to WHO guideline for HIV drug resistance threshold, all newly HIV-1 diagnosed patients at voluntary counseling and testing centers in March 2010 were consecutively included. We modified the criteria of patient selection, and we selected men and women more than 18 years old. The counseling and testing sites were located in CESAC (Centre d'Ecoute, d'Animation et de Conseil) in Bamako, USAC Commune V (Unite de Soins de'Animation et de Conseils) in Bamako, and the Nianankoro Fomba Hospital (HNF) in Ségou.

Protease (PR) and reverse transcriptase (RT) sequencing was performed using the Viroseq method (Abbott and Celera Diagnostics). Drug resistance mutations were identified according to the 2009 update on surveillance drug resistance mutations list as follows: (1) NRTIs: D67E/G/N, T69D, K70E/R, L74I/V, V75A/M/S/T, F77L, Y115F, F116Y, Q151M, M184I/V, L210W, T215Y/F/I/S/C/D/V/E, K219E/N/Q/R; (2) NNRTIs: L100I, K101E/P, K103N/S, V106A/M, V179F, Y181C/I/V, Y188C/H/L, G190A/E/S, P225H, M230L; and (3) PIs: L23I, L24I, D30N, V32I, M46I/L, I47A/V, G48M/V, I50L/V, F53L/Y, I54A/L/M/S/T/V, G73S73A/C/T, L76V, V82A/C/F/L/M/S/T, N83D, I84A/C/V, I85V, N88D/S, L90M.[14] Phylogenetic analyses were performed by estimating the relationships among RT and PR sequences and reference sequences of HIV-1 genetic subtypes and circulating recombinant forms (CRF) obtained from the Los Alamos Database (http://hiv-web.lanl.gov). Phylogenetic reconstruction was performed using a Kimura two-parameter model and the neighbor-joining method.

Results

Study population

We included 54 patients in this study; 22 patients were from CESAC, 21 from HNF, and 11 from USAC commune V. Clinical data were available for all patients. Only samples from 51 patients were amplifiable. Of these, 32 were women and 19 men. The median (IQR) age was 24 (22–27) years and the median (IQR) CD4 cells count was 380 (340–456) cells/mm^3 (Table 1). All analyses were performed on the 51 samples.

Subtype distribution

Three samples did not amplify and hence were not sequenced. Phylogenetic analyses showed that most of the patients, 34 (66.6%), were infected with CRF02_AG recombinant virus. The subtype distribution of the remaining patients was as follows: six (12%) CRF06_cpx, two (4%) CRF09_cpx, one (2%) CRF05_DF, one (2%) subtype F-2, one (2%) recombinant CRF1501_B, and six (12%) were not clustered with any of the known subtypes in the phylogenetic analysis. These viruses displayed *pol* gene mosaics, involving different subtypes. Each of the subtypes CRF01_AE and A-1 were present in five of six isolates. The subtype distribution is shown in Fig. 1A and the unknown subtype is classified in Fig. 1B.

Resistance mutations

Resistance analysis among the 51 samples showed at least one drug resistance mutation in four samples, leading to a primary resistance prevalence of 7.8% [95% confidence interval (CI 95), 2.2–18.9%]. All four patients who harbored resistant viruses were infected with the CRF02_AG subtype. One patient from Ségou (MLRP07) harbored a resistance mutation and the three other patients who were harboring mutations were from Bamako. NRTI resistance mutations were found in two samples (3.9%; CI 95, 0.5–13.5%), T215Y mutation in one patient and M184V in another patient. NNRTI resistance mutations were detected in samples from two patients (3.9%; CI 95, 0.5–13.5%), both exhibiting the K103N mutation. A major PI resistance mutation (I54V) was present in one patient (2%; CI 95, 0.00–10.4%); the same patient had the M184V mutation, implying dual class resistance.

Discussion

Here, we report a 7.8% (2.2–18.9%) prevalence of primary drug resistance mutations in recently diagnosed, ARV-naive HIV-infected patients from Mali in 2010. This shows that HIV-1 isolates exhibiting ARV resistance mutations are circulating among treatment-naive patients in Mali. We hypothesize that the level of resistance observed in the current study underestimates primary resistance in the population since minority resistant variants, which are undetectable by conventional genotyping, were not assessed in our study. Studies have shown that some minority resistant variants have clinical implications; in particular, NNRTI-resistant variants in minority proportions may impact virological response to an NNRTI-based regimen.[15,16]

Our study fulfilled almost all the criteria recommended in the WHO HIV drug resistance (HIVDR) threshold survey method.[14] Specifically, the median age of the patients in our study was 24 years, consistent with the HIVDR recommended threshold of under 25 years. In addition, as recommend by the WHO: (1) patients were consecutively included, (2) the number of samples was >47, and (3) there was no known exposure to ARV drugs, including PMTCT in pregnant women. Furthermore, the survey was conducted in small

Table 1. Patients Description with Sociodemographic and Biological Data

Patient ID	*Sex*	*Age (years)*	*CD4 cells/mm^3*	*HIV-1 subtypes*	*Resistance–associated mutation*	*Drug which mutations confer resistance*
MLRP01	M	24	678	CRF 06_cpx	–	–
MLRP02	M	32	529	CRF 02_AG	–	–
MLRP03	F	21	430	CRF 02_AG	–	–
MLRP04	F	22	348	CRF02_AG	–	–
MLRP05	F	23	352	CRF06_cpx	–	–
MLRP06	F	25	406	CRF 02_AG	–	–
MLRP07	F	26	290	CRF 02_AG	K103N	NVP, EFV
MLRP08	M	27	320	CRF 02_AG	–	–
MLRP09	F	26	340	CRF 02_AG	–	–
MLRP10	F	26	360	CRF 02_AG	–	–
MLRP11	F	28	502	CRF09_cpx	–	–
MLRP12	M	30	498	U	–	–
MLRP13	F	29	620	U	–	–
MLRP14	M	27	270	CRF 02_AG	–	–
MLRP15	F	24	380	CRF 02_AG	–	–
MLRP16	M	22	338	U	–	–
MLRP17	F	21	326	CRF 02_AG	–	–
MLRP18	F	29	512	CRF 02_AG	T215Y	d4t, AZT
MLRP19	F	18	456	CRF 02_AG	–	–
MLRP20	M	19	342	CRF 02_AG	–	–
MLRP21	F	19	368	CRF 06_cpx	–	–
MLRP22	M	20	416	CRF 1501_B	–	–
MLRP23	F	28	412	CRF 02_AG	–	–
MLRP24	F	24	431	F2	–	–
MLRP25	F	24	348	CRF 02_AG	–	–
MLRP26	F	26	422	CRF 06_cpx	–	–
MLRP27	M	25	451	U	–	–
MLRP28	F	23	228	CRF 02_AG	–	–
MLRP29	F	22	359	CRF 02_AG	–	–
MLRP30	F	20	273	CRF09_cpx	–	–
MLRP31	M	22	286	CRF 02_AG	M184V/154V	3TC, FTC/IDV, NFV, LPV, FosAPV
MLRP32	F	25	348	CRF 02_AG	–	–
MLRP33	M	28	321	CRF 02_AG	–	–
MLRP34	F	30	356	U	–	–
MLRP35	M	31	376	CRF 02_AG	K103N	NVP, EFV
MLRP36	F	27	495	CRF 02_AG	–	–
MLRP37	F	22	276	CRF 06_cpx	–	–
MLRP38	M	23	508	CRF 02_AG	–	–
MLRP39	F	24	462	CRF 02_AG	–	–
MLRP40	F	25	365	CRF 02_AG	–	–
MLRP41	M	24	297	CRF 02_AG	–	–
MLRP42	F	28	398	CRF 02_AG	–	–
MLRP43	F	24	394	U	–	–
MLRP44	M	22	402	CRF 05_DF	–	–
MLRP45	M	28	298	CRF 02_AG	–	–
MLRP46	F	31	473	CRF 02_AG	–	–
MLRP47	M	18	356	CRF 06_cpx	–	–
MLRP48	F	20	476	CRF 02_AG	–	–
MLRP49	M	22	511	CRF 02_AG	–	–
MLRP50	F	26	428	CRF 02_AG	–	–
MLRP51	M	23	512	CRF 02_AG	–	–

geographic areas, based in the capital cities where ARV drugs have been widely available for more than 3 years, and available to at least 20% of eligible individuals (ARV coverage is approximately 85% in Mali). The WHO HIVDR criteria recommends ensuring that patients have been HIV infected within the past 3 years, but we could not include this in our study because we lacked tools to precisely determine the date of infection.

The level of primary resistance (7.8%) found in our study is higher than 1.5% and 2.5% reported by Derache and others in 2005 and 2006, respectively.[6] This raises concerns about the routine use of an NNRTI plus two NRTIs in first-line regimens without resistance testing in Mali because detected resistance mutations can compromise the effectiveness of NRTIs (AZT, d4T, 3TC, FTC) and NNRTIs (NVP and EFV) used in first-line therapy. Primary resistance to indinavir was detected in one

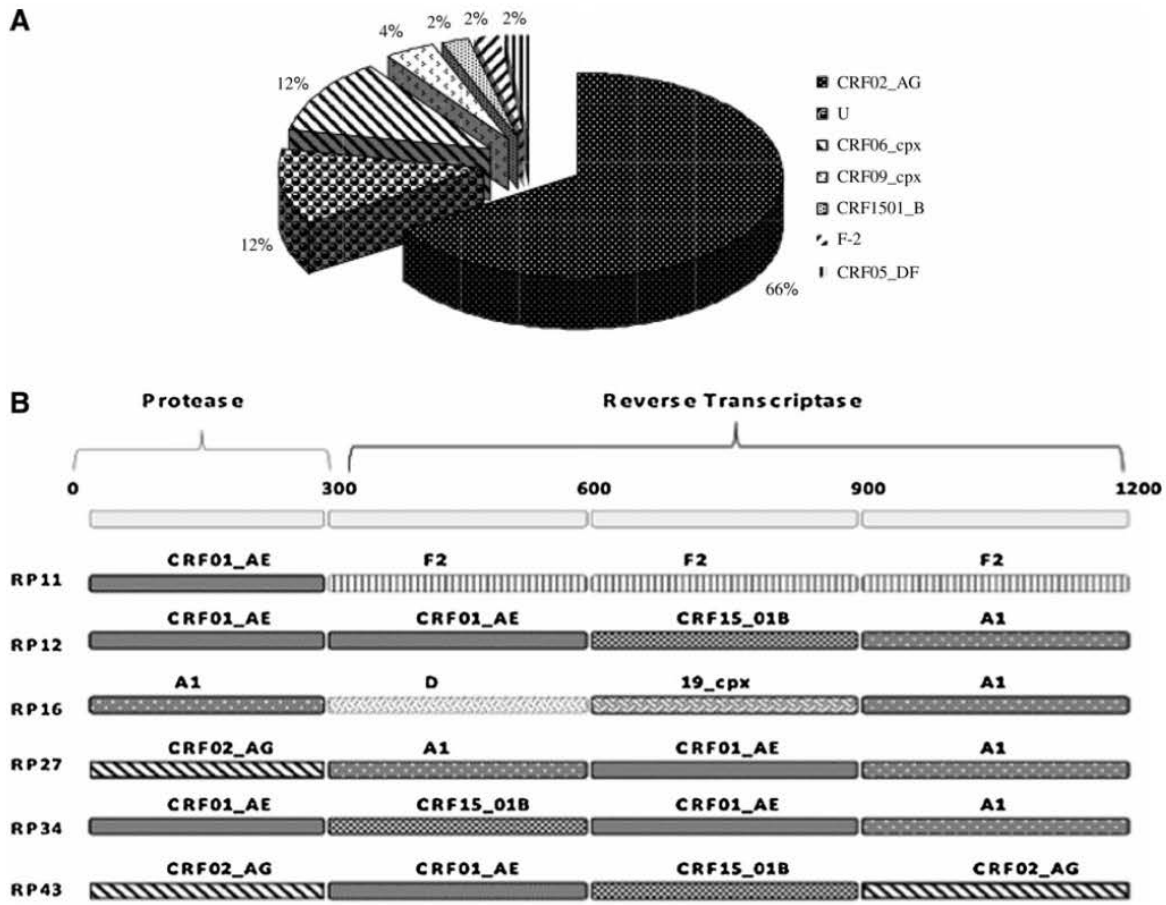


FIG. 1. **(A)** Graphic representation of subtype distribution in the study population. **(B)** *Pol* gene mosaic viruses ("unknown, U" viruses) with recombination points and subtypes involved.

patient, but a case could be made for considering a ritonavir-boosted PI containing regimen in some first-line patients, provided barriers such as higher costs and limited PI availability can be overcome. Taken together, our findings emphasize the need to optimize virological control in patients on treatment and expand access to viral load monitoring and resistance testing in resource-limited settings. Given that primary resistance has exceeded 5% in the major cities in Mali, surveillance in other parts of the country is warranted to obtain estimates of the level and evolution of HIV-1 primary drug resistance throughout the country.

Acknowledgments

We thank Aminata Traore, Tako Ballo, and Ouman Dembele (CSLS/MS in Mali); Hamar Alassane Traore, Moussa Youssoufa Maiga (Point-G and Gabriel Toure Teaching Hospital), and Dionke Fofana (Esther Paris); Ousmane Traore (HCNLS); Issiaka Sogodogo and Doucoure Mariam Diallo (HNF de Se Ségou); and Alain Akonde, Louis Pizarro (Solthis), and Victoria Koita (Bamako) for helpful technical assistance in all resistance set-up programs in SEREFO. We thank the National Scientific Committee of AIDS in Mali.

This study was funded by the Cellule Sectorielle de Lutte contre le Sida from the Ministry of Health in Mali (CSLS/MS), the French Agency ESTHER (Ensemble pour une Solidarite Therapeutique en Reseau) in Mali, and The Northwestern University-United States National Institutes for Health/Fogarty International Center Grant D43TW007995.

This work will be presented in Geneva (Switzerland) in poster presentation at the 6th Francophone conference on HIV/AIDS, Abstract number 378.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests to declare exist.

References

1. Samake S, Traore S, Ba S, *et al.:* Quatrieme Enquête Démographique et de Santé du Mali. EDSMIV 2006;CPS/MS:410.
2. Maiga A, Marcelin A, Fofana D, *et al.:* Virological failure to second-line antiretroviral treatment and profile of resistance mutations among patients infected with HIV-1 in Bamako. 18th IAS Conference in Vienna, 2010. Abstract TUPE0127.
3. Tebit DM, Sangare L, Tiba F, *et al.:* Analysis of the diversity of the HIV-1 pol gene and drug resistance associated

changes among drug-naive patients in Burkina Faso. J Med Virol 2009;81(10):1691–1701.
4. Ayouba A, Lien TT, Nouhin J, *et al.:* Low prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in untreated, recently infected patients from Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Senegal, Thailand, and Vietnam: The ANRS 12134 study. AIDS Res Hum Retroviruses 2009;25(11):1193–1196.
5. Toni T, Masquelier B, Minga A, *et al.:* HIV-1 antiretroviral drug resistance in recently infected patients in Abidjan, Cote d'Ivoire: A 4-year survey, 2002–2006. AIDS Res Hum Retroviruses 2007;23(9):1155–1160.
6. Derache A, Maiga AI, Traore O, *et al.:* Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. J Antimicrob Chemother 2008;62(3):456–463.
7. Derache A, Traore O, Koita V, *et al.:* Genetic diversity and drug resistance mutations in HIV type 1 from untreated patients in Bamako, Mali. Antivir Ther 2007;12(1):123–129.
8. Haidara A, Chamberland A, Sylla M, *et al.:* High level of primary drug resistance in Mali. HIV Med 2010;11(6):404–411.
9. Abreu CM, Brindeiro PA, Martins AN, *et al.:* Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates circulating in pregnant women from Mozambique. Arch Virol 2008;153(11):2013–2017.
10. Eshleman SH, Laeyendecker O, Parkin N, *et al.:* Antiretroviral drug susceptibility among drug-naive adults with recent HIV infection in Rakai, Uganda. AIDS 2009;23(7):845–852.
11. Galluzzo CM, Germinario EA, Bassani L, *et al.:* Antiretroviral resistance mutations in untreated pregnant women with HIV infection in Uganda and Rwanda. AIDS Res Hum Retroviruses 2007;23(11):1449–1451.
12. Hamers RL, Siwale M, Wallis CL, *et al.:* HIV-1 drug resistance mutations are present in six percent of persons initiating antiretroviral therapy in Lusaka, Zambia. J Acquir Immune Defic Syndr 2011;55(1):95–101.
13. Charpentier C, Bellecave P, Cisse M, *et al.:* High prevalence of antiretroviral drug resistance among HIV-1-untreated patients in Guinea-Conakry and in Niger. Antivir Ther 2011;16(3):429–433.
14. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, *et al.:* Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. PLoS One 2009;4(3):e4724.
15. Johnson JA, Li JF, Wei X, *et al.:* Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associate with reduced treatment efficacy. PLoS Med 2008;5(7):e158.
16. Paredes R, Lalama CM, Ribaudo HJ, *et al.:* Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. J Infect Dis 2010;201(5):662–671.

Address correspondence to:
Almoustapha Issiaka Maiga
Unite d'Epidemiologie Moleculaire de
la Resistance du VIH aux ARV
SEREFO
FMPOS
Universite des Sciences Techniques et
des Technologies de Bamako—USTTB
Bamako
Mali

E-mail: amaiga@icermali.org

ARTICLE 2.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013

Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naive patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses

Sidonie Lambert-Niclot, Charlotte Charpentier, A. Storto, **Djeneba Bocar Fofana**, Cathia Soulié, Slim Fourati, Benoit Visseaux, Marc Wirden, Laurance Morand-Joubert, Bernard Masquelier, Phillippe Flandre, Diane Descamps et Anne-Geneviève Marcelin

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkt003

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naive patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses

S. Lambert-Niclot[1]*, C. Charpentier[2], A. Storto[2], D. B. Fofana[1], C. Soulié[1], S. Fourati[1], B. Visseaux[2], M. Wirden[1], L. Morand-Joubert[3], B. Masquelier[4], P. Flandre[1], V. Calvez[1], D. Descamps[2] and A.-G. Marcelin[1]

[1]APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, UPMC Univ Paris 06, INSERM U 943, Paris, France; [2]APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Virologie, HUPNVS, Université Paris Diderot, Paris 7, PRES Sorbonne Paris Cité, EA4409, Paris, France; [3]AP-HP, Saint Antoine Hospital, INSERM U 943 and Pierre et Marie Curie University, Paris, France; [4]Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux and UMR5234, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

*Corresponding author. Department of Virology, Pitié-Salpêtrière Hospital, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33142177401; Fax: +33142177411; E-mail: sidonie.lambert@psl.aphp.fr

Received 22 October 2012; returned 12 December 2012; revised 28 December 2012; accepted 31 December 2012

Objectives: The prevalence of rilpivirine, emtricitabine and tenofovir resistance-associated mutations (RAMs), described *in vitro* and *in vivo*, was determined in antiretroviral-naive patients.

Patients and methods: From 2008 to 2011, 1729 treatment-naive patients were tested for resistance by bulk sequencing. We studied the primary rilpivirine RAMs (K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, H221Y, F227C and M230I/L) and other potential rilpivirine-associated mutations (V90I, L100I, K101T, E138S, V179D/I, Y188L, V189I, G190A/E/S and M230V). We also studied the M184V/I and K65R mutations for emtricitabine and tenofovir, respectively.

Results: Among 1729 sequences, half of patients had B-subtype viruses and the other half non-B (with 26.7% CRF02, $n=461$). Primary rilpivirine RAMs were infrequent (4.6%, $n=79$) and the most prevalent were E138A (3%, $n=52$), E138K, (0.3%, $n=5$), H221Y (0.3%, $n=5$), E138G (0.2%, $n=4$) and Y181C (0.2%, $n=4$). The frequency of the primary rilpivirine RAMs was similar between B and non-B subtypes. The other potential rilpivirine-associated mutations that were most prevalent were V179I (8.4%, $n=145$), V90I (3.8%, $n=65$) and V189I (2.3%, $n=40$). The common V179I, V189I and V90I polymorphisms have not been associated with virological failure in Phase 3 clinical studies. By the ANRS algorithm, 4.9% ($n=84$) of samples were resistant to rilpivirine, 3.7% ($n=32$) of B-subtype viruses versus 6% ($n=52$) of non-B-subtype viruses ($P=0.02$, χ^2 test). The prevalence of K65R and M184I/V was 0.06% (1/1729) and 1% (18/1729), respectively. The prevalence of K103N was 2% (35/1729).

Conclusions: The prevalence of rilpivirine, emtricitabine and tenofovir resistance mutations was very low in antiretroviral-naive patients. The prevalence of resistance to rilpivirine (4.9%, $n=84$) was not statistically different from the prevalence of efavirenz and nevirapine resistance in our population.

Keywords: primary resistance, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs

Introduction

Current international,[1] European[2] and French[3] HIV-1 infection treatment guidelines recommend that patients who are symptomatic or who have a low CD4+ cell count receive combination therapy of two nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)[4] and a potent third drug from another class, such as a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), a protease inhibitor or an integrase strand transfer inhibitor. In the USA, treatment is recommended for all HIV-1-infected patients. There is still a need for new NNRTIs with activity against NNRTI-resistant viruses, a higher barrier to the development of resistance and reduced amounts of adverse events.

Indeed, efavirenz and nevirapine are first-generation NNRTIs that are component drugs in many antiretroviral regimens, but they have a relatively low barrier to the development of resistance and exhibit considerable cross-resistance to each other.[5]

© *The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at REDAR on June 17, 2014

Moreover, they also have a number of associated safety concerns, including hepatotoxicity, neuropsychiatric disorders and cutaneous rash.[4,6–9]

Etravirine and rilpivirine are second-generation NNRTIs providing alternatives to the commonly used first-generation NNRTI-based regimens.[5] Etravirine is approved for use in combination with other antiretrovirals in treatment-experienced patients with HIV-1 infection who have experienced previous virological failure with an NNRTI.[10] Rilpivirine is indicated in the USA in combination with other antiretroviral drugs for the treatment of patients with HIV-1 infection who are antiretroviral-naive,[11] and in the EU in combination with other antiretroviral drugs for the treatment of patients with HIV-1 infection who are antiretroviral-naive with an HIV-1 RNA level of ≤100 000 copies/mL.[12] Rilpivirine was also approved in the USA as a single-tablet regimen with tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine.[13] Rilpivirine is active *in vitro* against wild-type viruses and retains activity against most NNRTI-resistant HIV-1 strains, including the most frequently transmitted NNRTI mutation K103N.[14–16]

Clinical virology data are available from the Phase 2 TMC278-C204 study, a dose-ranging study in HIV-1-infected treatment-naive patients[17,18] and from two large Phase 3 double-blind studies of efficacy and safety in treatment-naive HIV-infected subjects of 25 mg of rilpivirine once daily and 600 mg of efavirenz once daily in combination with tenofovir/emtricitabine (ECHO) or in combination with two NRTIs (THRIVE).[19,20]

Based on the available *in vitro* and clinical data, any of the following amino acid substitutions when present at baseline are likely to reduce the antiviral activity of rilpivirine and are considered primary rilpivirine resistance-associated mutations (RAMs): K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, H221Y, F227C and M230I/L. These substitutions are included in the US FDA list of rilpivirine-associated substitutions as noted in the US package insert.[12,21] Other potential rilpivirine-associated mutations are V90I, L100I, K101T, E138S, V179D/I, Y188L, V189I, G190A/E/S and M230V as cited in *in vitro* or/and *in vivo* studies[14,22] and/or the Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS) algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org/2011/tab3.html).

The aim of this study was to evaluate the prevalence of primary rilpivirine RAMs in a large panel of patients who were infected with HIV-1 B and non-B subtypes and had never received antiretroviral treatment. We also studied the other potentially relevant rilpivirine mutations and the NRTI RAMs M184V/I and K65R that are relevant to the use of emtricitabine/lamivudine and tenofovir, respectively.

Methods

Study population

The present study included 1729 patients who were infected with HIV-1 subtype B ($n=867$) and subtype non-B ($n=862$) from university hospitals: Bichat Claude Bernard (Paris), Pitié Salpêtrière (Paris), Pellegrin (Bordeaux) and Saint Antoine (Paris). Samples have been analysed for resistance testing by bulk sequencing from 2008 to 2011. HIV-1 seropositive patients were eligible for this study if they had never been exposed to antiretroviral drugs before the time of sampling. For each patient a single HIV-1 sequence was included in this analysis; we choose the first available, closest to diagnosis if more sequences were available for one patient.

Genotypic resistance analyses and interpretation

Bulk sequences of the reverse transcriptase genes on RNA were determined in each laboratory using the ANRS consensus technique primer sequences described at http://www.hivfrenchresistance.org. Primary rilpivirine RAMs were defined as K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, H221Y, F227C and M230I/L.[21] The other potentially rilpivirine-associated substitutions studied were V90I, L100I, K101T, E138S, V179D/I, Y188L, V189I, G190A/E/S and M230V. Resistance evaluated according to the ANRS algorithm was defined as having at least one mutation of K101E/P, E138A/G/K/Q/R/S, V179L, Y181C/I/V, Y188L, H221Y and M230I/L/V, or having L100I+K103N together (http://www.hivfrenchresistance.org/2011/tab3.html). Resistance to efavirenz and nevirapine was evaluated according to the ANRS algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org/2011/tab3.html). Subtype determination was on the basis of the reverse transcriptase and protease coding regions (SmartGene, Switzerland; http://www.smartgene.com).

Statistical analyses

Between-group comparisons were carried out using Fisher's exact test for categorical variables and using the χ^2 test for continuous variables. The SAS statistical software program version 9.2 was used for analyses.

Results

Distribution of HIV-1 subtypes in antiretroviral-naive patients

Among the 1729 analysed sequences from patients who had never received antiretroviral treatment, 867 were B subtype and 862 non-B subtype. The distribution of non-B subtypes was as follows: CRF02_AG, 461 (26.7%); A1, 59 (3.4%); C, 54 (3.1%); G, 39 (2.3%); D, 34 (2%); CRF01_AE, 34 (2%); CRF06_cpx, 21 (1.2%) and other subtypes, 160 (9.3%) (Table 1).

Prevalence of primary rilpivirine RAMs

As defined by the November 2011 International Antiviral Society–USA (IAS-USA) list, the primary rilpivirine RAMs found were rare (4.6%, 79/1729). The most prevalent in this analysis were E138A, in 52 cases (3%); E138K, in 5 cases (0.3%); H221Y, in 5 cases (0.3%); E138G, in 4 cases (0.2%) and Y181C, in 4 cases (0.2%). The frequencies of rilpivirine RAMs are depicted in Figure 1.

Table 1. Distribution of HIV-1 subtypes ($n=1729$)

Subtype	Number of patients (%)
B	867 (50.1)
CRF02_AG	461 (26.7)
A1	59 (3.4)
C	54 (3.1)
G	39 (2.3)
D	34 (1.9)
CRF01	34 (1.9)
CRF06	21 (1.2)
Others	160 (9.3)

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at REDAR on June 17, 2014

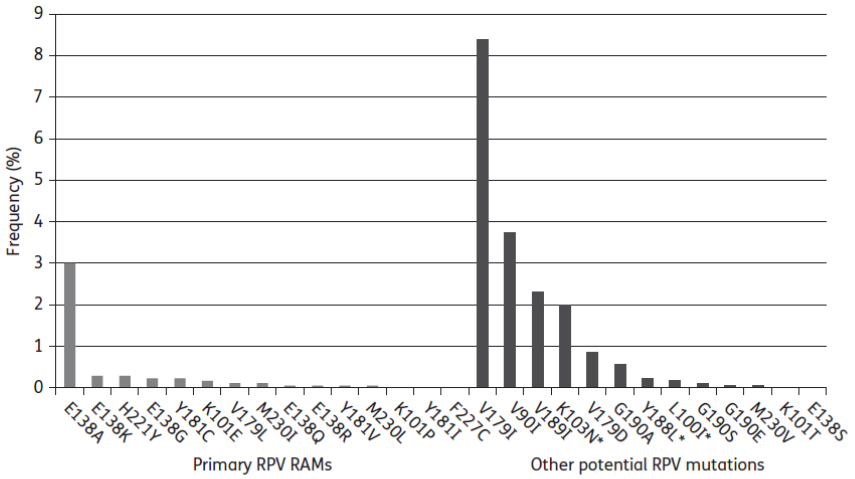


Figure 1. Prevalence of rilpivirine (RPV) mutations. *Y188L and L100I+K103N were considered primary RPV resistance mutations in the ANRS algorithm.

In B-subtype viruses the rilpivirine RAMs found to be most prevalent in this analysis were E138A, in 17 cases (2%); E138G, in 3 cases (0.3%); E138K, in 3 cases (0.3%) and H221Y, in 2 cases (0.2%). In non-B-subtype viruses, the rilpivirine RAMs found to be most prevalent were E138A, in 35 cases (4.1%); Y181C, in 3 cases (0.3%); H221Y, in 3 cases (0.3%); K101E, in 2 cases (0.2%); E138K, in 2 cases (0.2%) and M230I, in 2 cases (0.2%).

Using the IAS-USA list of November 2011 for the analysis, most viruses with a primary rilpivirine RAM had only one RAM: 71 sequences (4.1%) had one rilpivirine mutation and 5 sequences (0.3%) had two rilpivirine mutations. No patient had a sequence with three or more rilpivirine RAMs (Figure 2). The distribution of the number of rilpivirine RAMs was significantly different between B- and non-B-subtype viruses (Fisher's test, $P=0.01$). Indeed non-B-subtype viruses had more rilpivirine RAMs than B-subtype viruses. This difference is due mainly to the mutation E138A, which was twice as common among non-B subtypes.

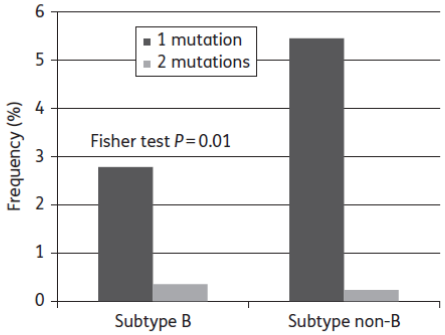


Figure 2. Number of primary rilpivirine RAMs.

Prevalence of other potential rilpivirine-associated mutations

The other potential rilpivirine-associated mutations found to be most prevalent in this analysis were V179I in 145 cases (8.4%), V90I in 65 cases (3.8%) and V189I in 40 cases (2.3%). The frequencies of other rilpivirine mutations are depicted in Figure 1. In B-subtype viruses, the mutations found to be most prevalent in this analysis were V179I in 50 cases (5.8%) and V90I in 41 cases (4.7%). In non-B-subtype viruses, the mutations found to be most prevalent in this analysis were V179I in 95 cases (11%), V189I in 26 cases (3%) and V90I in 24 cases (2.8%).

Among the 1729 sequences, 344 (19.9%) harboured at least one rilpivirine mutation (rilpivirine RAMs plus other rilpivirine mutations): 295 sequences (17%) had one rilpivirine mutation, 44 sequences (2.5%) had two rilpivirine mutations, 2 sequences (0.12%) had three rilpivirine mutations and 3 sequences (0.17%) four rilpivirine mutations (Figure 3). The distribution of the number of rilpivirine mutations (rilpivirine RAMs plus other rilpivirine mutations) was significantly different between the B and non-B subtypes (Fisher's test, $P=0.0255$) with more rilpivirine RAMs and other rilpivirine mutations in non-B-subtype viruses. This difference is due mainly to the polymorphic mutation as V179I, the primary rilpivirine RAM E138A and the other NNRTI-associated mutation V189I, all of which were twice as common among non-B subtypes.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at REDAR on June 17, 2014

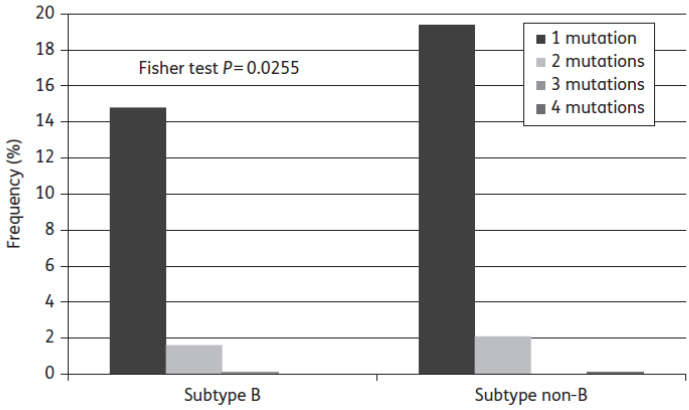


Figure 3. Number of rilpivirine mutations (primary RAMs plus other potential mutations).

Resistance

According to the ANRS algorithm, 4.9% of samples were resistant to rilpivirine, 3.7% of B-subtype viruses versus 6% of non-B-subtype viruses ($P=0.02$, χ^2 test). The prevalence of the combination L100I+K103N was 3/1729 (0.17%) and L100I was present only in association with K103N; whereas K103N alone was present in 35 cases (2%). The prevalence of the tenofovir mutation K65R and the emtricitabine/lamivudine mutations M184I/V were 0.06% (1/1729) and 1% (18/1729), respectively, and there was no difference between B and non-B subtypes. According to the ANRS algorithm, resistance to efavirenz and nevirapine in our population was 3.7% and 3.8%, respectively.

Discussion

Our study was the first evaluating the prevalence of primary rilpivirine RAMs and other potential rilpivirine-associated mutations in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients ($n=1729$) and comparing the prevalence of these mutations between B-subtype and non-B-subtype viruses. According to our analysis using both the IAS and ANRS lists, most (95%) of the samples from treatment-naive patients had no primary rilpivirine RAMs and the most prevalent primary rilpivirine RAM was E138A in 3%, which is similar to the Vingerhoets *et al.*[23] study. If we expanded our analysis to include the other potential rilpivirine-associated mutations, the percentage of samples from treatment-naive patients with no rilpivirine mutations fell to 81%. Of the other potential rilpivirine mutations, the most prevalent were polymorphic V179I (8%) and V90I (3.8%). The prevalence of V179I is increased in non-B subtypes (11%), whereas the prevalence of V90I is increased in B-subtype viruses (4.7%). The mutation V179I was also found in HIV-1 mutant strains selected *in vitro* in the presence of rilpivirine.[14] On its own, the mutation V179I does not induce a reduced susceptibility to rilpivirine (<2-fold; antivirogram assay with a cut-off of 2.7), but the mutation V179I can induce an increase of rilpivirine resistance when it is present in combination with other mutations such as Y181C or L100I+Y181C.[14,22] Moreover, the Phase 3 ECHO and THRIVE studies showed that V179I and V90I mutations could be treatment emergent, although they were present in a low proportion of rilpivirine virological failures (3%–8%).[22] Moreover, the V179I and V90I mutations only conferred phenotypic resistance to rilpivirine when present in combination with primary rilpivirine RAMs.[22] The common V179I, V189I and V90I polymorphisms have not been associated with an increased risk of virological failure in Phase 3 clinical studies.[23,24]

In the present study, the most prevalent primary rilpivirine RAM was E138A (3%), and this prevalence is more important in non-B-subtype viruses (4.1%). *In vitro* a site-directed mutant harbouring E138A alone presented a fold change in the antiretroviral activity of rilpivirine of 2.5.[14] *In vivo*, it has been shown that E138A is a RAM associated with a decrease in susceptibility to rilpivirine.[22] Moreover, Haddad *et al.*[25] showed that the reduction in rilpivirine susceptibility caused by E138A was found to be similar (with a fold change of 1.9 in the PhenoSense assay with a cut-off of 2.0) to that observed with the primary rilpivirine RAMs E138G, K and Q. Several studies have shown the E138A mutation to be an etravirine RAM.[26,27] A German study also showed a low prevalence of three studied NNRTI RAMs (E138K, Y181I/V and K101E), but their population comprised pre-treated patients.[28]

Overall, the prevalence of resistance to rilpivirine in our study was 4.9%, according to the ANRS resistance algorithm. This prevalence was not statistically different from efavirenz and nevirapine resistance in our population: 3.7% and 3.8%, respectively. The prevalence of the primary rilpivirine RAMs determined here was consistent with the prevalence of that of NNRTI resistance mutations from the Odyssée study, where 2.4% of samples had greater than or equal to one primary NNRTI mutation.[29] The prevalence of rilpivirine, emtricitabine/lamivudine and tenofovir resistance mutations was very low in antiretroviral-naive patients. However, resistance testing should be considered before initiation of NNRTI-based treatment in antiretroviral-naive patients, as recommended in the EU Summary of Product Characteristics.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at REDAR on June 17, 2014

Acknowledgements

We thank G. Le Mallier and P. Grange for their technical assistance.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)' (grant agreement no. 223131) and the ARVD (Association de Recherche en Virologie et Dermatologie).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Thompson MA, Aberg JA, Cahn P *et al*. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2010; **304**: 321–33.

2 Clumeck N, Pozniak A, Raffi F. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med* 2008; **9**: 65–71.

3 Yeni P. Rapport 2010 sur la prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH sous la direction du Pr. Patrick Yéni–Ministère en charge de la santé. http://www.sante.gouv.fr/rapport-2010-sur-la-prise-en-charge-medicale-des-personnes-infectees-par-le-vih-sous-la-direction-du-pr-patrick-yeni.html (28 December 2012, date last accessed).

4 Department of Health and Human Services. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf?bcsi_scan_CBA24F92DB3F63E2=0&bcsi_scan_filename=adultandadolescentgl.pdf (28 December 2012, date last accessed).

5 Ghosn J, Chaix M-L, Delaugerre C. HIV-1 resistance to first- and second-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 2009; **11**: 165–73.

6 Boehringer-Ingelheim. *FDA Label for Viramune (Nevaripine) Tablets and Oral Suspension*. 2008. http://bidocs.boehringer-ingelheim.com/BIWebAccess/ViewServlet.ser?docBase=renetnt&folderPath=/Prescribing+Information/PIs/Viramune/Viramune.pdf (28 December 2012, date last accessed).

7 Bristol-Meyers Squibb Company. *FDA Label for Sustiva (Efavirenz) Capsules and Tablets*. 2009. http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sustiva.pdf (28 December 2012, date last accessed).

8 Pérez-Molina JA. Safety and tolerance of efavirenz in different antiretroviral regimens: results from a national multicenter prospective study in 1,033 HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2002; **3**: 279–86.

9 van Leth F, Phanuphak P, Ruxrungtham K *et al*. Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and lamivudine: a randomised open-label trial, the 2NN Study. *Lancet* 2004; **363**: 1253–63.

10 Deeks ED, Keating GM. Etravirine. *Drugs* 2008; **68**: 2357–72.

11 European Medicines Agency. *Edurant® 25 mg Film-Coated Tablets: Summary of Product Characteristics*. 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002264/WC500118874.pdf (28 December 2012, date last accessed).

12 Tibotec Pharmaceuticals. *Edurant™ (Rilpivirine) Tablets: US Prescribing Information*. 2012. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/202022s000lbl.pdf (28 December 2012, date last accessed).

13 Gilead Sciences Inc. *FDA Label for COMPLERA™ (Emtricitabine/Rilpivirine/Tenofovir Disoproxil Fumarate) Tablets (package insert)*. 2012. http://www.gilead.com/pdf/complera_pi.pdf (28 December 2012, date last accessed).

14 Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J *et al*. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 718–27.

15 Guillemont J, Pasquier E, Palandjian P *et al*. Synthesis of novel diarylpyrimidine analogues and their antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *J Med Chem* 2005; **48**: 2072–9.

16 Janssen PAJ, Lewi PJ, Arnold E *et al*. In search of a novel anti-HIV drug: multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6-dimethylphenyl]amino]-2-pyrimidinyl]amino]benzonitrile (R278474, rilpivirine). *J Med Chem* 2005; **48**: 1901–9.

17 Pozniak AL, Morales-Ramirez J, Katabira E *et al*. Efficacy and safety of TMC278 in antiretroviral-naive HIV-1 patients: week 96 results of a phase IIb randomized trial. *AIDS* 2010; **24**: 55–65.

18 Wilkin A, Pozniak AL, Morales-Ramirez J *et al*. Long-term efficacy, safety, and tolerability of rilpivirine (RPV, TMC278) in HIV type 1-infected antiretroviral-naive patients: week 192 results from a phase IIb randomized trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012; **28**: 437–46.

19 Cohen CJ, Molina J-M, Cahn P *et al*. Efficacy and safety of rilpivirine (TMC278) versus efavirenz at 48 weeks in treatment-naive HIV-1-infected patients: pooled results from the phase 3 double-blind randomized ECHO and THRIVE trials. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**: 33–42.

20 Molina J-M, Cahn P, Grinsztejn B *et al*. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* 2011; **378**: 238–46.

21 Johnson VA, Calvez V, Günthard HF *et al*. 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2011; **19**: 156–64.

22 Rimsky L, Vingerhoets J, Van Eygen V *et al*. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **59**: 39–46.

23 Vingerhoets J, Rimsky L, Van Eygen V *et al*. Preexisting mutations in the rilpivirine Phase III trials ECHO and THRIVE: prevalence and impact on virologic response. *Antivir Ther* 2012; doi:10.3851/IMP2358.

24 Van Eygen V, Thys K, Vingerhoets J *et al*. Deep sequencing analysis of baseline samples from patients treated with rilpivirine in the Phase III studies ECHO and THRIVE shows no association between the presence of minority resistance-associated variants and virological failure. In: *Abstracts of the International Workshop on HIV and Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, Sitges, Spain, 2012*. Abstract 27. *Antivir Ther* 2012; **17** Suppl 1: A35.

25 Haddad M, Napolitano LA, Paquet AC *et al*. Impact of HIV-1 reverse transcriptase E138 mutations on rilpivirine drug susceptibility. In: *Abstracts of the International Workshop on HIV and Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, Los Cabos, Mexico*. Abstract 10. *Antivir Ther* 2011; **16** Suppl 1: A18.

26 Marcelin AG, Descamps D, Tamalet C *et al*. Emerging mutations and associated factors in patients displaying treatment failure on an etravirine-containing regimen. *Antivir Ther* 2012; **17**: 119–23.

27 Tambuyzer L, Nijs S, Daems B *et al*. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase on phenotypic susceptibility and virologic response to etravirine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **58**: 18–22.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at REDAR on June 17, 2014

28 Reinheimer C, Doerr HW, Stürmer M. Prevalence of TMC278 (rilpivirine) associated mutations in the Frankfurt Resistance Database. *J Clin Virol* 2012; **53**: 248–50.

29 Descamps D, Assoumou L, Charpentier C *et al.* Stable prevalence of transmitted drug resistance mutations in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients between 2006/07 and 2010/11 in France. In: *Abstracts of the Nineteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA, USA, 2012*. Poster 733. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

Downlo

ARTICLE 3.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014

High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali

Djeneba Bocar Fofana, Cathia Soulié, Sidonie Lambert-Niclot, Mariam Sylla, Zaina Ait-Arkoub, Fodié Diallo, Issouf Alassane Maiga, Ousmane Koita, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Amoustapha Issiaka Maiga,

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published May 22, 2014

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dku153

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali

D. B. Fofana[1–3]*, C. Soulié[1–3], A. Baldé[4], S. Lambert-Niclot[1–3], M. Sylla[5], Z. Ait-Arkoub[1–3], F. Diallo[6], B. Sangaré[7], M. Cissé[6], I. A. Maïga[8], S. Fourati[1–3], O. Koita[4], V. Calvez[1–3], A. G. Marcelin[1–3] and A. I. Maïga[4,9]

[1]*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S1136, F-75005 Paris, France;* [2]*Inserm, UMR_S 1136, F-75005 Paris, France;* [3]*AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Virologie, F-75013 Paris, France;* [4]*Unité d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance du VIH, SEREFO-FMOS/FAPH, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali;* [5]*Service de Pédiatrie, CHU Gabriel Toure, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali;* [6]*CESAC, Bamako, Mali;* [7]*USAC Commune I, Bamako, Mali;* [8]*ESTHER, Bamako, Mali;* [9]*Laboratoire d'Analyses Médicales, CHU Gabriel Toure, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali*

*Corresponding author. Department of Virology, Pitié-Salpêtrière Hospital, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33-142175844; Fax: +33-142177411; E-mail: djesfof@gmail.com

Received 30 January 2014; returned 21 March 2014; revised 4 April 2014; accepted 4 April 2014

Objectives: In resource-limited settings, few data are available on virological failure after long-term first-line antiretroviral therapy. This study characterized the genotypic resistance patterns at the time of failure after at least 36 months of a first-line regimen in Mali, West Africa.

Methods: Plasma samples from 84 patients who were receiving first-line antiretroviral treatment and with an HIV-1 RNA viral load (VL) >1000 copies/mL were analysed. Genotypic resistance testing was performed and HIV-1 drug resistance was interpreted according to the latest version of the National Agency for HIV and Hepatitis Research algorithm.

Results: At the time of resistance testing, patients had been treated for a median of 60 months (IQR 36–132 months) and had a median CD4 cell count of 292 cells/mm^3 (IQR 6–1319 cells/mm^3), a median HIV-1 RNA level of 28 266 copies/mL (IQR 1000–2 938 495 copies/mL) and a median genotypic susceptibility score of 1 (IQR 1–4). The prevalence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) resistance mutations was 78% and 82%, respectively. Viruses were resistant to at least one drug in 92% of cases. Although etravirine and rilpivirine were not used in the first-line regimens, viruses were resistant to etravirine in 34% of cases and to rilpivirine in 49% of cases. The treatment duration, median number of NRTI and NNRTI mutations and some reverse transcriptase mutations (T215Y/F/N, L210W, L74I, M41L and H221Y) were associated with the VL at virological failure.

Conclusions: This study demonstrated a high level of resistance to NRTIs and NNRTIs, compromising second-generation NNRTIs, for patients who stayed on long-term first-line regimens. It is crucial to expand the accessibility of virological testing in resource-limited settings to limit the expansion of resistance and preserve second-line treatment efficacy.

Keywords: failure, NNRTIs, Africa

Introduction

In resource-limited settings HIV-1 remains a crucial global health problem.[1] Most people living with HIV and new HIV infections worldwide are in sub-Saharan Africa. The roll-out of antiretroviral agents has increased in these countries, expanding the emergence of HIV drug resistance mutations. The WHO has developed a global HIV drug resistance prevention and assessment strategy that includes the surveillance of acquired HIV drug resistance in populations receiving antiretroviral therapy (ART). The WHO now recommends HIV viral load (VL) monitoring to detect virological failure in populations receiving ART, which can be challenging because of the high cost and reagent stock-outs. In addition, genotypic tests are not widely available in resource-poor countries.[2] However, recent studies assessing the outcome of ART in these countries have shown conflicting results despite limitations in ART access and monitoring. Some studies have shown good virological success achieved after 6, 12 or 24 months of ART and

© *The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on May 23, 2014

limited consequences of drug resistance mutations for second-line options.[1,3–5] Others have shown that patients who failed first-line treatment harboured a considerable number of resistance mutations.[6,7] The long-term consequences of first-line ART failure without virological monitoring in resource-limited settings are unclear. In Cameroon a high proportion of patients on first-line ART for at least 36 months with virological failure (VL >1000 copies/mL) showed drug resistance. Fortunately, the recommended second-line ART regimens were effective. To our knowledge, antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Mali has been reported only prior to ART (transmitted resistance) or early (within the first year) in the course of ART failure. There is a need to characterize resistance patterns at the time of failure after long-term first-line therapy to consider the possible consequences for future treatment options.

The objective of this study was to characterize genotypic resistance patterns at the time of treatment failure in patients in Mali after at least 36 months of a first-line regimen and to discuss the possible implications of these findings for the future treatment strategy in this region.

Methods

Study setting

The HIV and Tuberculosis Research and Training Center SEREFO is a laboratory and clinical centre in Bamako (Mali) based around bacterial and viral disease research. It is located in the Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry at the University of Sciences Techniques and Technologies of Bamako (USTTB). SEREFO is mainly focused on drug resistance in HIV and tuberculosis, as well as on the immune responses relating to these two diseases. SEREFO is an international collaboration between the NIH and the University of Bamako (Mali). Other collaborators (ESTHER, SOLTHIS and Northwestern University, Chicago) have joined the centre since 2008.

The Malian guidelines for antiretroviral agents are based on the new WHO guidelines, which recommend a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) as a first-line regimen. In the current Malian revised guidelines of November 2013, the country recommends a preferred first-line regimen of tenofovir+lamivudine+efavirenz, or alternatively zidovudine+lamivudine+nevirapine; zidovudine+lamivudine+efavirenz; tenofovir+lamivudine+nevirapine; or abacavir+lamivudine+efavirenz.

VL testing is recommended as routine standard care and is now available for virological monitoring in several regional districts and the capital. Resistance testing is available in two laboratories (SEREFO and the National Institute for Research and Public Health). However, the lack of qualified human resources and the management of these tools remain a challenge.

Study population and specimen collection

From May 2011 to June 2012, all patients who had been receiving first-line ART for at least 36 months from different clinical centres in Bamako were screened. As recommended by the national guidelines VL testing was performed every 6 months and 84 patients with a VL ≥1000 copies/mL on the last plasma sample obtained were enrolled in the study. The last plasma HIV VL with >1000 copies/mL and HIV drug resistance testing were performed at SEREFO. Patients' sociodemographic and clinical characteristics were collected: sex, age, VL, CD4 cell count and ART regimen.

Laboratory testing

Plasma HIV-1 VL was measured using the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assay (Abbott Molecular). The genotypic analysis of reverse transcriptase and protease genes was performed with the commercial assay ViroSeq (Celera Diagnostics, CA, USA) on plasma samples. Sequences were interpreted according to the most recent version of the National Agency for HIV and Hepatitis Research (ANRS) algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org/). In this study, sequences associated with full and intermediate resistance according to the ANRS algorithm were considered to be resistant. The genotypic susceptibility score (GSS) was calculated for each patient according to the treatment received (the number of active drugs). To classify the HIV-1 strains according to subtype, phylogenetic analyses were performed by estimating the relationships between pol sequences using SmartGene software.

Data management and analysis

Statistical analyses were performed using StatView® software (version 5). Univariate analyses (Spearman and Mann–Whitney tests) were performed.

Ethical consideration

The study was approved by the Malian National Ethics Committee of Health and Life Sciences for the protection of human subjects at the USTTB. Written informed consent was obtained from all the study participants.

Results

Patient characteristics

Eighty-four HIV-1-infected patients with first-line treatment failure after 3 years on ART were analysed. The patients' characteristics are presented in Table 1. As recommended by the national guidelines the patients were mainly treated with two NRTIs plus one NNRTI— lamivudine/zidovudine/nevirapine (59%) or lamivudine/stavudine/nevirapine (35%)—with 6% of patients receiving a regimen that included didanosine, tenofovir, abacavir, nevirapine, efavirenz or indinavir. Patients had been exposed to lamivudine (99%), zidovudine (54%), stavudine (38%), abacavir (11%), tenofovir (10%) and didanosine (1%). In relation to the NNRTI, patients were treated with nevirapine or efavirenz.

Fifty-four viruses were of subtype CRF02_AG. The other subtypes were CRF30_0206 ($n=8$), CRF06_cpx ($n=7$), CRF01_AE ($n=2$), CRF45_cpx ($n=1$), CRF09_cpx ($n=1$), A1 ($n=1$), C ($n=1$), D ($n=1$), F2 ($n=1$) and G ($n=1$) and the unique recombinant form URF ($n=4$) (see Table 1).

Genotyping resistance tests

Resistance analysis was performed for the 84 HIV-1-infected patients. The prevalence of resistance mutations was 78%, 82% and 2% for NRTIs, NNRTIs and protease inhibitors (PIs), respectively (Figure 1a–c). The prevalence of at least one resistance mutation in two classes was observed in 61% of cases. The median number of mutations was 1 (IQR 0–7), 2 (IQR 0–5) and 3 (IQR 1–5) for NRTIs, NNRTIs and PIs, respectively.

The most frequent NRTI resistance mutation was M184V (76%). Thymidine analogue mutations M41L (15%), D67N (6%), L210W (11%) and T215Y/F/N (31%) were also found. Other mutations present were L74I in 4% of patients, K219E/Q in 6%, K70R/E

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on May 23, 2014

Table 1. Sociodemographic, clinical and biological characteristics of the study population

Parameter	Value
Age (years), median (IQR)	33 (18–52)
Female, %	61
CD4 count (cells/mm^3), median (IQR)	292 (6–1319)
Plasma HIV-1 RNA (copies/mL), median (IQR)	28 266 (1000–2 938 495)
Duration of ART (months), median (IQR)	60 (36–132)
GSS of treatment, median (IQR)	1 (1–4)
Number of NRTI mutations, median (IQR)	1 (0–7)
Number of NNRTI mutations, median (IQR)	2 (0–5)
Number of PI minor mutations, median (IQR)	3 (1–5)
Antiretroviral regimen at time of genotyping, %	
lamivudine/zidovudine/nevirapine	59
lamivudine/stavudine/nevirapine	35
other[a]	6
Subtype distribution, *n*	
CRF02_AG	54
CRF30_0206	8
CRF06_cpx	7
URF	4
CRF01_AE	2
other[b]	7

[a]Different combinations including didanosine, tenofovir, abacavir, nevirapine, efavirenz or indinavir.
[b]CRF45_cpx ($n=1$), CRF09_cpx ($n=1$), A1 ($n=1$), C ($n=1$), D ($n=1$), F2 ($n=1$) and G ($n=1$).

in 12%, Y115F, V75T, T69N and E44D. The mutation K65R was present in 4% of patients. The Q151M complex and the insertion at codon 69 were not found. For the NNRTI mutations, K103N was the most represented (37%). The other NNRTI mutations were Y181C/V (30%), V179E/I/M/T (17%), V90I (17%), K101E/H/R/P (15%), G190A/S (14%), V106A/I/M (14%), H221Y (12%), E138A/G/K/Q (11%), A98G (6%), M230I/L (5%), P225H (4%) and L100I (2%). Of the PI mutations, the major PI resistance mutation L90M was found in one patient. For five patients, the minor PI resistance mutations L89M, V77I, L63P, H69K/R/Q, M36I, K20I/M/R/T, G16E, L10V/I were present.

Interpretation of drug resistance

The results showed that 92% of patients harboured a virus with resistance to at least one drug after a minimum of 3 years of antiretroviral treatment. Overall, the median GSS of the 84 patients was 1.

In terms of NRTIs, viruses were resistant to lamivudine (79%), zidovudine (36%), stavudine (40%), abacavir (17%), tenofovir (25%) and didanosine (6%) (Figure 1d). For NNRTIs, viruses were resistant to nevirapine (77%) and efavirenz (76%). Although etravirine and rilpivirine had never been used in first-line treatment, the prevalence of resistance to them was 34% and 49%, respectively. In relation to the PIs, two patients displayed a virus resistant to saquinavir (2%), atazanavir (1%) and indinavir (1%). However, all viruses were susceptible to lopinavir and darunavir.

Factors associated with drug resistance

For the NRTIs, abacavir and tenofovir resistance were strongly associated with a high VL at failure ($P=0.003$ and $P=0.02$), a low CD4 cell count at failure ($P=0.006$ and $P=0.002$), a low GSS of treatment ($P=0.001$ and $P=0.0006$), a high median number of NRTI mutations ($P<0.001$ and $P=0.003$) and the duration of treatment ($P=0.02$ and $P=0.02$), respectively. Etravirine and rilpivirine resistance was associated with a high median number of NRTI mutations and NNRTI mutations ($P=0.03$ and $P=0.0003$ for etravirine; $P=0.04$ and $P=0.005$ for rilpivirine).

Discussion

This study examined HIV-1 resistance mutation patterns in Malian patients with virological treatment failure after at least 3 years of first-line therapy and predicted their impact on susceptibility to second-line drugs. Only 8% of these patients showed wild-type viruses susceptible to all the antiretroviral agents available in Mali. Nearly all the patients (92%) displayed viruses that were resistant to at least one drug and dual-class resistance was seen in 61% of cases. Patients harboured viruses with a high prevalence of resistance mutations, especially to NRTIs and NNRTIs, at 78% and 82%, respectively.

In previous studies in Mali, the prevalence of primary resistance was reported to be ~10%.[8–10] In addition, a low level of resistance has been shown with treatment failure after a median of 18 months of first-line drugs and a recent study involving treatment failure with second-line agents showed that 8.6% of patients harboured viruses that were resistant to all the drugs available in Mali.[5,11] Otherwise, most of resistance data available in Africa have come from early failures with first-line treatment and have shown limited levels of resistance. These studies have reported that >70% of patients carried virus with ≥1 drug resistance mutation after 12 months of treatment.[12,13] However, very few studies in this setting have evaluated patterns of resistance mutation after a long period of treatment.[14,15] In the present study, a high level of HIV-1 resistance in patients with a long duration of treatment failure was observed. Compared with other studies, our patients had a very long duration on ART, with a median of 60 months.[13] Thus, the high prevalence of resistance in this study is likely to be the result of a limited availability of virological monitoring (VL and resistance testing), leading to a prolonged failure of ART and an accumulation of resistance mutations.

The NRTI combinations used were essentially lamivudine with zidovudine or stavudine, explaining the predominance of thymidine-associated mutations (TAMs) and M184V mutations at the point of failure. In our population, the K65R mutation was infrequently detected, probably because CRF02_AG was the main circulating subtype and does not easily select this mutation in comparison with subtype C.[15] These results suggest that tenofovir remains a good option for second-line therapy. The prevalence of resistance to first-generation NNRTIs was high, at 76% for efavirenz and 77% for nevirapine. These results were in agreement with studies showing a high rate of resistance to first-generation

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on May 23, 2014

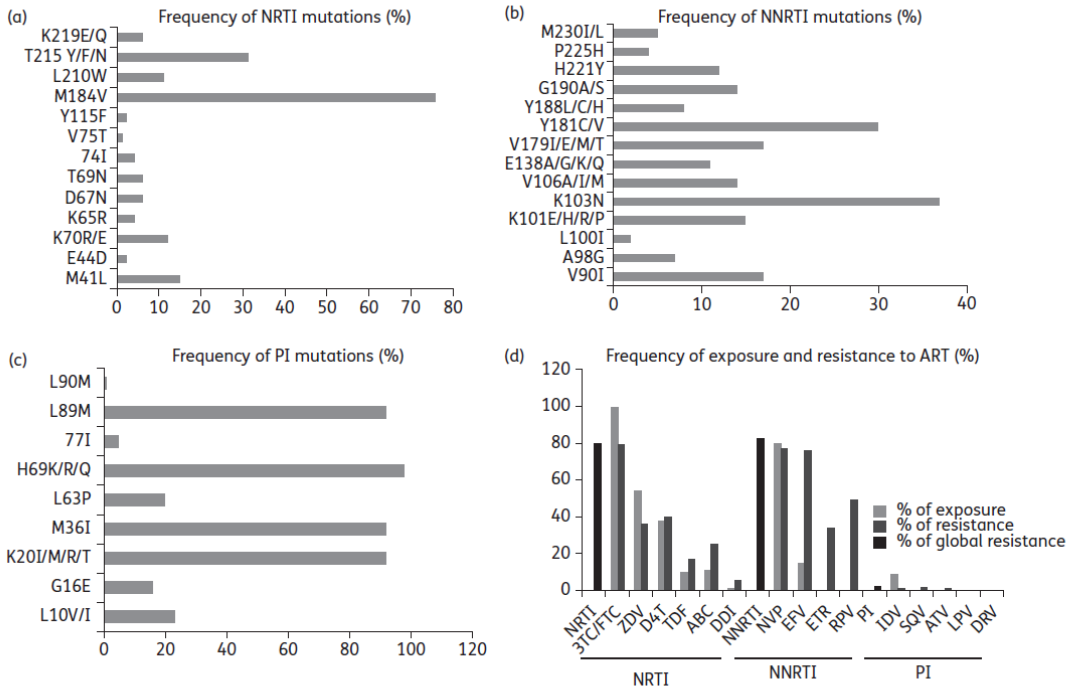


Figure 1. Frequency of mutations, exposure and resistance to ART. 3TC, lamivudine; FTC, emtricitabine; ZDV, zidovudine; D4T, stavudine; TDF, tenofovir; ABC, abacavir; DDI, didanosine; NVP, nevirapine; EFV, efavirenz; RPV, rilpivirine; IDV, indinavir; SQV, saquinavir; ATV, atazanavir; LPV, lopinavir; DRV, darunavir.

NNRTIs in Africa, compromising the second-generation agents (etravirine and rilpivirine) in use in that setting.[13,16] It has been shown that the duration of initial NNRTI exposure was associated with an increasing likelihood of developing etravirine resistance and that previous exposure to nevirapine was associated with a poorer virological response to etravirine.[17] Indeed, while second-generation NNRTIs are not used in Mali, a 34% rate of resistance to etravirine and a 49% rate of resistance to rilpivirine were found in the present study, confirming the risk of accumulation of resistance and reinforcing the need for routine VL monitoring in resource-limited settings. Furthermore, we have reported high frequencies of NNRTI (as Y181C) mutations, which means that the second-generation NNRTIs etravirine or rilpivirine are unlikely to be effective as part of second-line ART if combined with two NRTIs.

The national antiretroviral guidelines recommend routine VL monitoring to identify virological failure. However, findings have shown that individuals are maintained on failing regimens, with perhaps an accumulation of further resistance (especially TAMs) and progression to immunological and clinical failure. In addition, to identify factors associated with drug resistance to different salvage ART agents, we focused on the second-line drugs available in Mali (abacavir, tenofovir, second-generation NNRTIs and all PIs). For NRTIs, resistance to abacavir and tenofovir was strongly associated with a high VL, a low CD4 count, a low GSS for treatment, the median number of NRTI mutations and the duration of treatment. The level of resistance to etravirine and rilpivirine was associated with a high median number of NRTI and NNRTI mutations. Similar findings for second-generation NNRTI resistance under prolonged viraemia have been reported.[16] These results raised questions about the potential increased risk of transmitted drug resistance related to these high levels of acquired drug resistance.

However, some patients remained susceptible to tenofovir, abacavir and didanosine, which are mainly used in the second-line regimen in Mali. This is in agreement with WHO guidelines in resource-limited settings, which recommend these molecules as NRTIs for second-line ART regimens, in combination with a ritonavir-boosted PI. The heat-stable fixed-dose combinations atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir are the preferred boosted PI options for second-line ART.

This study has some limitations. No data on the baseline prevalence of HIV drug resistance were available for the population studied; however, the prevalence of transmitted antiretroviral resistance has been reported to be moderate in Mali.[9,10] The duration of virus replication under treatment was not precisely determined because routine VL monitoring was not feasible in all centres and there was no information about adherence to the ART regimen. Nevertheless, this reflected the routine care and makes our findings generalizable to other resource-limited countries. Finally, our results were from the country's capital, where the

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on May 23, 2014

monitoring of patients appears to be better because virological tools are more available even though not widely used. Thus, it will be interesting to extend this work to more rural parts of the country.

In conclusion, in patients showing virological treatment failure after at least 3 years of a first-line NNRTI-based regimen, a high level of resistance to NNRTIs was observed and limits the effectiveness of second-generation NNRTIs for use in second-line treatment. However, a moderate level of NRTI resistance was found and suggests the possible use of tenofovir in second-line regimens. These data show that it is crucial to expand the accessibility of virological testing (HIV RNA assays, resistance tests) to preserve the effectiveness of tenofovir as part of a second-line regimen.

Acknowledgements

We thank G. Le Mallier and P. Grange for their technical assistance. We also thank Hamar Alassane Traore (National Point-G Hospital in Mali) and Moussa Y Maiga (Gabriel Toure Hospital in Mali) for their advice during the study process. We thank all of the contributors who participated in this study. We thank the National Scientific Committee of AIDS in Mali, the healthcare personnel, laboratory staff of France and patients.

Funding

This work was supported by Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'—(grant agreement no. 223131), the ARVD (Association de Recherche en Virologie et Dermatologie) and ESTHER (Ensemble pour une Solidarité Hospitalière en Réseau) in Mali.

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Department of Health and Human Services. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. http://aidsinfo.nih.gov/guidelines (2 April 2014, date last accessed).

2 WHO. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Adults and Adolescents in Resource-limited Settings: Toward Universal Access. Recommendations for a Public Health Approach*. http://www.who.int/hiv/pub/arv/en/ (2 April 2014, date last accessed).

3 Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R *et al*. Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 155–66.

4 Kouanfack C, Montavon C, Laurent C *et al*. Low levels of antiretroviral-resistant HIV infection in a routine clinic in Cameroon that uses the World Health Organization (WHO) public health approach to monitor antiretroviral treatment and adequacy with the WHO recommendation for second-line treatment. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1318–22.

5 Marcelin AG, Jarrousse B, Derache A *et al*. HIV drug resistance after the use of generic fixed-dose combination stavudine/lamivudine/nevirapine as standard first-line regimen. *AIDS* 2007; **21**: 2341–3.

6 Dagnra AY, Vidal N, Mensah A *et al*. High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lome, Togo. *J Int AIDS Soc* 2011; **14**: 30.

7 Hosseinipour MC, van Oosterhout JJ, Weigel R *et al*. The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy. *AIDS* 2009; **23**: 1127–34.

8 Derache A, Maiga AI, Traore O *et al*. Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 456–63.

9 Haidara A, Chamberland A, Sylla M *et al*. High level of primary drug resistance in Mali. *HIV Med* 2010; **11**: 404–11.

10 Maiga AI, Fofana DB, Maiga AC *et al*. Transmitted antiretroviral drug resistance in newly HIV-infected and untreated patients in Segou and Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013; **29**: 182–6.

11 Maiga AI, Fofana DB, Cisse M *et al*. Characterization of HIV-1 antiretroviral drug resistance after second-line treatment failure in Mali, a limited-resources setting. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2943–8.

12 Hamers RL, Sigaloff KC, Wensing AM *et al*. Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-Saharan African countries: implications for second-line ART strategies. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1660–9.

13 Ugbena R, Aberle-Grasse J, Diallo K *et al*. Virological response and HIV drug resistance 12 months after antiretroviral therapy initiation at 2 clinics in Nigeria. *Clin Infect Dis* 2012; **54** Suppl 4: S375–80.

14 Aghokeng AF, Kouanfack C, Eymard-Duvernay S *et al*. Virological outcome and patterns of HIV-1 drug resistance in patients with 36 months' antiretroviral therapy experience in Cameroon. *J Int AIDS Soc* 2013; **16**: 18004.

15 Manasa J, Lessells RJ, Skingsley A *et al*. High-levels of acquired drug resistance in adult patients failing first-line antiretroviral therapy in a rural HIV treatment programme in KwaZulu-Natal, South Africa. *PLoS One* 2013; **8**: e72152.

16 Bunupuradah T, Ananworanich J, Chetchotisakd P *et al*. Etravirine and rilpivirine resistance in HIV-1 subtype CRF01_AE-infected adults failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens. *Antivir Ther* 2011; **16**: 1113–21.

17 Marcelin AG, Flandre P, Descamps D *et al*. Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 72–7.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on May 23, 2014

ARTICLE 4.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013

Genetic barrier to the development of resistance to rilpivirine and étravirine between HIV-1 subtypes CRF02_AG and B

Djeneba Bocar Fofana, Cathia Soulié, AmoustaphaIssiaka Maiga, Slim Fourati, Isabelle Malet, Marc Wirden, Anatole Tounkara, Hamar AlassaneTraoré, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Sidonie Lambert-Niclot,

J Antimicrob Chemother 2013; **68**: 2515–2520
doi:10.1093/jac/dkt251 Advance Access publication 5 July 2013

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Genetic barrier to the development of resistance to rilpivirine and etravirine between HIV-1 subtypes CRF02_AG and B

D. B. Fofana[1]*, C. Soulie[1], A. I. Maiga[2,3], S. Fourati[1], I. Malet[1], M. Wirden[1], A. Tounkara[3], H. A. Traore[4], V. Calvez[1], A. G. Marcelin[1] and S. Lambert-Niclot[1]

[1]APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, UPMC Univ Paris 06, INSERM U 943, F75013 Paris, France; [2]Laboratoire d'Analyses Médicales, CHU Gabriel Toure, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali; [3]Unité d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance du VIH, SEREFO-FMPOS, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali; [4]Médecine Interne, CHU Point G, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali

*Corresponding author. Department of Virology, Pitié-Salpêtrière Hospital, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33142175844; Fax: +33142177411; E-mail: djesfof@gmail.com

Received 13 February 2013; returned 30 April 2013; revised 21 May 2013; accepted 23 May 2013

Objectives: It has been demonstrated for some drugs that the genetic barrier, defined as the number of genetic transitions and/or transversions needed to produce a resistance mutation, can differ between HIV-1 subtypes. We aimed to assess differences in the genetic barrier for the evolution of resistance to the second-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors etravirine and rilpivirine in subtypes B and CRF02_AG in antiretroviral-naive patients.

Methods: An analysis was undertaken of 25 substitutions associated with etravirine and rilpivirine resistance at 12 amino acid positions in 267 nucleotide sequences (136 HIV-1 B and 131 HIV-1 CRF02_AG subtypes) of the reverse transcriptase gene.

Results: The majority (7/12) of amino acid positions studied were conserved between the two HIV-1 subtypes, leading to a similar genetic barrier. Different predominant codons between the subtypes were observed in 5/12 positions (90, 98, 179, 181 and 227), with an effect on the calculated genetic barrier only at the V179D and V179F codons (2.5 versus 3.5 for V179D, and 2.5 versus 5 for V179F, respectively, for subtype B versus subtype CRF02_AG).

Conclusions: The majority of amino acids involved in etravirine and rilpivirine resistance showed a high degree of conservation of the predominant codon between the B and CRF02_AG subtypes. For rilpivirine, the genetic barrier was the same between the two subtypes. Nevertheless, subtype CRF02_AG showed a higher genetic barrier to acquiring mutations V179D and V179F (mutations associated with resistance to etravirine) compared with subtype B, suggesting that it would be more difficult to produce resistance to etravirine in the CRF02_AG subtype than the B subtype.

Keywords: genetic barrier, subtype B, subtype CRF02_AG

Introduction

The long-term success of HIV-1 treatment with antiretrovirals (ARVs) is often hindered by incomplete viral suppression and the resulting emergence of drug resistance. The non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) are a therapeutic class that is routinely used, in combination with other ARV drugs.[1] Despite their proven efficacy, the clinical use of first-generation NNRTIs (nevirapine and efavirenz) has been limited by their low genetic barrier to resistance, their broad cross-resistance[2] and a number of associated side effects.[3] To try to overcome these limitations, a second generation of NNRTIs has been developed, including etravirine and rilpivirine.[2,4]

Etravirine was recently approved for NNRTI-experienced adults if adequately supported by other active drugs in the second-line regimen.[3] Clinical trials such as DUET[5,6] and *in vitro* studies have helped to define a list of 18 etravirine resistance-associated mutations (RAMs): V90I, A98G, L100I, K101E/H/P, V106I, E138A/G/K/Q, V179D/F/T, Y181C/I/V and M230L.[7]

Rilpivirine has been indicated in combination with other ARV drugs for ARV-naive patients in the USA and European Union.[8] Indeed, rilpivirine showed non-inferiority of efficacy compared with efavirenz in two Phase III studies.[9,10] *In vitro* and *in vivo* studies allowed the definition of a total of 15 RAMs for rilpivirine:[11,12] K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, H221Y, F227C and M230I/L.[7]

© *The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 30, 2014

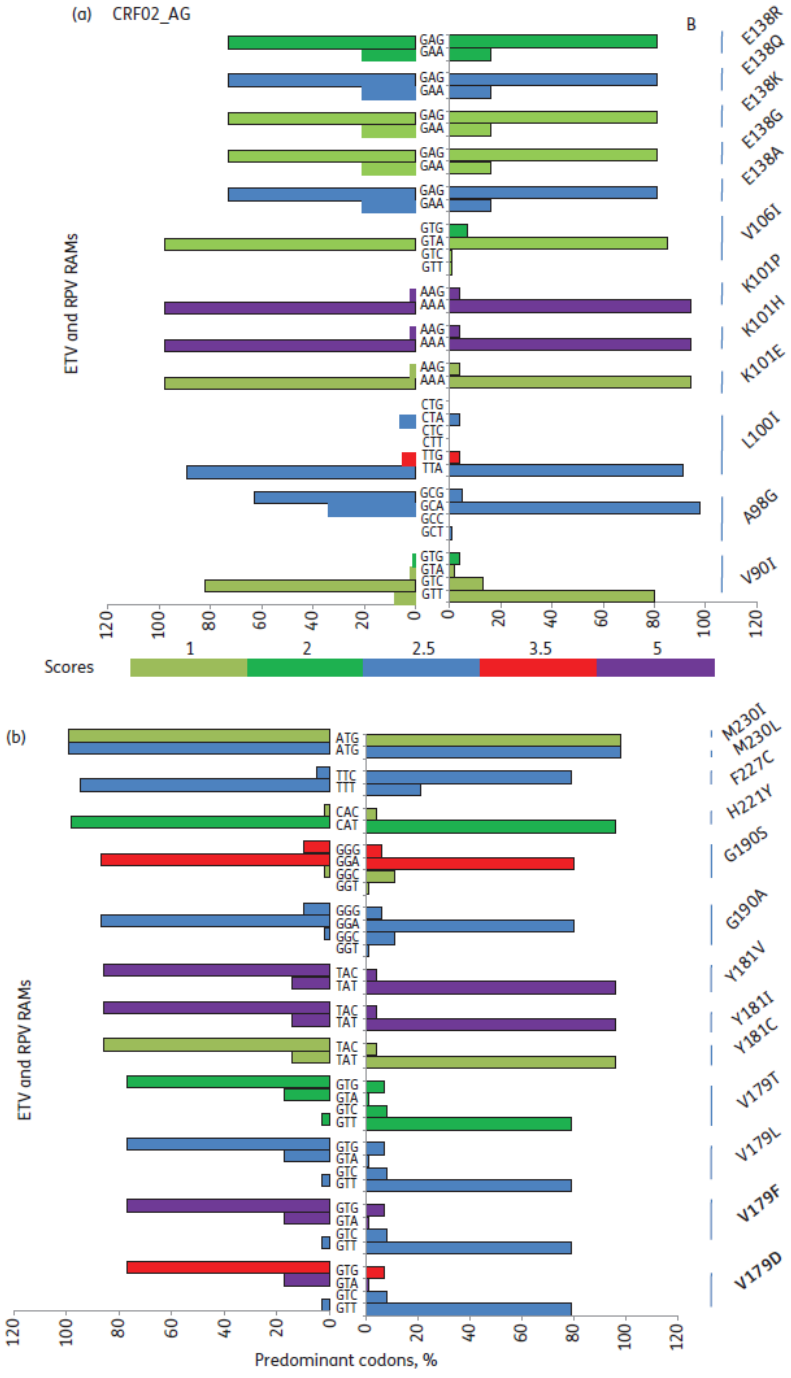
Table 1. Evaluation of the genetic barrier defined by the number of transitions (S) or transversions (V) required to obtain mutated codons conferring resistance to etravirine and rilpivirine

			Codon %																
RT codon position	Substitution	Codon	subtype B	subtype CRF02_AG	Mutational resistance codon[a,b]														Minimal score[c]
90	V90I	GTT	80	8	*ATT*	1S	*ATC*	2S	*ATA*	1S.1V									**1**
		GTC	13	82		2S		1S		1S.1V									**1**
		GTA	2	2		1S.1V		1S.1V		1S									**1**
		GTG	4	1		1S.1V		1S.1V		2S									**2**
98	A98G	GCT	1	0	*GGT*	1V	*GGC*	1S.1V	*GGA*	2V	*GGG*	2V							**2.5**
		GCC	0	0		1S.1V		1V		2V		2V							**2.5**
		GCA	90	34		2V		2V		1V		1S.1V							**2.5**
		GCG	5	63		2V		2V		1S.1V		1V							**2.5**
100	L100I	TTA	95	89	*ATT*	2V	*ATC*	2V	*ATA*	1V									**2.5**
		TTG	5	5		2V		2V		1S.1V									**3.5**
		CTT	0	0		1V		1S.1V		2V									**2.5**
		CTC	0	0		1S.1V		1V		2V									**2.5**
		CTA	5	6		2V		2V		1V									**2.5**
		CTG	0	0		2V		2V		1S.1V									**3.5**
101	K101E	AAA	94	98	*GAA*	1S	*GAG*	2S											**1**
		AAG	4	2		2S		1S											**1**
	K101H	AAA	94	98	*CAT*	2V	*CAC*	2V											**5**
		AAG	4	2		2V		2V											**5**
	K101P	AAA	94	98	*CCT*	3V	*CCC*	3V	*CCA*	2V	*CCG*	1S.2V							**5**
		AAG	4	2		3V		3V		1S.2V		2V							**5**
106	V106I	GTT	1	0	*ATT*	1S	*ATC*	2S	*ATA*	1S.1V									**1**
		GTC	1	0		2S		1S		1S.1V									**1**
		GTA	85	98		1S.1V		1S.1V		1S									**1**
		GTG	7	0		1S.1V		1S.1V		2S									**2**
138	E138A	GAA	16	21	*GCT*	2V	*GCC*	2V	*GCA*	1V	*GCG*	1S.1V							**2.5**
		GAG	81	73		2V		2V		1S.1V		1V							**2.5**
	E138G	GAA	16	21	*GGT*	1S.1V	*GGC*	1S.1V	*GGA*	1S	*GGG*	2S							**1**
		GAG	81	73		1S.1V		1S.1V		2S		1S							**1**
	E138K	GAA	16	21	*AAA*	1S	*AAG*	2S											**1**
		GAG	81	73		2S		1S											**1**
	E138Q	GAA	16	21	*CAA*	1V	*CAG*	1S.1V											**2.5**
		GAG	81	73		1S.1V		1V											**2.5**
	E138R	GAA	16	21	*CGT*	1S.2V	CGC	1S.2V	*CGA*	1S.1V	*CGG*	2S.1V	*AGA*	2S	*AGG*	3S			**2**
		GAG	81	73		1S.2V		1S.2V		2S.1V		1S.1V		3S		2S			**2**
179	V179D	GTT	79	3	*GAT*	1V	GAC	1S.1V											**2.5**
		GTC	8	0		1S.1V		1V											**2.5**
		GTA	1	17		2V		2V											**5**

		GTG	7	77		2V		1S.1V							**3.5**
	V179F	GTT	79	3	*TTT*	1V	TTC	1S.1V							**2.5**
		GTC	8	0		1S.1V		1V							**2.5**
		GTA	1	17		2V		2V							**5**
		GTG	7	77		2V		2V							**5**
	V179L	GTT	79	3	*TTA*	2V	TTG	2V	*CTT*	1V	*CTC*	1S.1V	*CTA*	2V	*CTG*	2V	**2.5**
		GTC	8	0		2V		2V		1S.1V		1V		2V		2V	**2.5**
		GTA	1	17		1V		1S.1V		2V		2V		1V		1S.1V	**2.5**
		GTG	7	77		1S.1V		1V		2V		2V		1 S.1V		1V	**2.5**
	V179T	GTT	79	3	*ACT*	2S	*ACC*	3S	*ACA*	2S.1V	*ACG*	2S.1V					**2**
		GTC	8	0		3S		2S		2S.1V		2S.1V					**2**
		GTA	1	17		2S.1V		2S.1V		2S		3S					**2**
		GTG	7	77		2S.1V		2S.1V		3S		2S					**2**
181	Y181C	TAT	96	14	*TGT*	1S	*TGC*	2S									**1**
		TAC	4	86		2S		1S									**1**
	Y181I	TAT	96	14	*ATT*	2V	*ATC*	1S.2V	*ATA*	3V							**5**
		TAC	4	86		1S.2V		2V		3V							**5**
	Y181V	TAT	96	14	*GTT*	2V	*GTC*	1S.2V	*GTA*	3V	*GTG*	3V					**5**
		TAC	4	86		1S.2V		2V		3V		3V					**5**
190	G190A	GGT	1	0	*GCT*	1V	*GCC*	1S.1V	*GCA*	2V	*GCG*	2V					**2.5**
		GGC	11	2		1S.1V		1V		2V		2V					**2.5**
		GGA	80	87		2V		2V		1V		1 S.1V					**2.5**
		GGG	6	10		2V		2V		1 S.1V		1V					**2.5**
	G190S	GGT	1	0	*TCT*	2V	*TCC*	1S.2V	*TCA*	3V	*TCG*	3V	*AGT*	1S	*AGC*	2S	**1**
		GGC	11	2		1S.2V		2V		3V		3V		2S		1S	**1**
		GGA	80	87		3V		3V		2V		1 S.2 V		1S.1V		1S.1V	**3.5**
		GGG	6	10		3V		3V		1S.2V		2V		1S.1V		1S.1V	**3.5**
221	H221Y	CAT	96	98	*TAT*	1V	*TAC*	2S									**2**
		CAC	4	2		2S		1S									**1**
227	F227C	TTT	21	95	*TGT*	1V	*TGC*	2V									**2.5**
		TTC	79	5		1S.1V		1V									**2.5**
230	M230I	ATG	100	100	*ATT*	1V	*ATC*	1V	ATA	1S							**1**
	M230L	ATG	100	100	*TTA*	1S.1V	*TTG*	1V	*CTT*	2V	*CTC*	2V	*CTA*	1 S.1V	*CTG*	1V	**2.5**
		GTC	8	0		2V		2V		1S.1V		1V		2V		2V	**2.5**
		GTA	1	17		1V		1S.1V		2V		2V		1V		1S.1V	**2.5**
		GTG	7	77		1S.1V		1V		2V		2V		1 S.1V		1V	**2.5**

[a]The resistance mutation codons are shown in italic.
[b]The number of transitions and transversions selected to calculate the minimal score is shown.
[c]The minimal score was taken for each codon with a single transition scored as 1 and a single transversion scored as 2.5. This minimal score is in bold.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 30, 2014



Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 30, 2014

The genetic barrier is a useful tool in the design of effective treatment strategies. Comprehensive analyses of genetic variations at known RAM sites have revealed some differences between the various HIV subtypes.[13] Indeed, the calculated genetic barrier might be similar between different HIV-1 subtypes for nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) and NNRTI classes, except for a few minor protease substitutions.[14] However, some recent studies have shown that the genetic barrier between subtypes B and CRF02_AG,[15] or CRF01_AE,[16] is similar for most of the major integrase RAMs.

In HIV infection, subtype B is mainly found in developed countries, whereas subtype CRF02_AG is highly prevalent in West Africa, although it is becoming more frequent in developed countries. Although NNRTIs are frequently used in West Africa and Europe, there are limited data on subtype CRF02_AG virus and the second generation of NNRTIs. The aim of this study was to assess differences in the genetic barrier for the evolution of etravirine and rilpivirine resistance substitutions between subtypes B and CRF02_AG in ARV-naive patients.

Methods

A total of 267 ARV-naive patients were included in this study (136 with subtype B virus and 131 with CRF02_AG). Bulk sequences of the reverse transcriptase gene on the RNA were amplified using the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) consensus technique described at http://www.hivfrenchresistance.org. We used the HXB2 reference sequence to compare the nucleotide changes in codons needed for an evolution from the wild-type to substitutions associated with drug resistance. To classify the HIV-1 strains according to subtype, phylogenetic analyses were performed by estimating the relationships between *pol* sequences using Smartgen software.

To calculate the genetic barrier, we used the method published by van de Vijver *et al.*[14] In summary, transitions were determined by the replacement of a purine by another purine (A↔G) or of a pyrimidine by another pyrimidine (C↔T), and transversions were determined by the replacement of a purine by a pyrimidine and vice versa: A↔C, A↔T, G↔C and G↔T).[14] To calculate the genetic barrier, the smallest number of transitions (scored as 1) and/or transversions (scored as 2.5) required for evolution to etravirine or rilpivirine RAMs was used. The genetic barrier was taken as the sum of the scores for a particular drug resistance substitution.

Results

We studied 25 substitutions associated with etravirine and rilpivirine resistance at 12 amino acid positions (V90I, A98G, L100I, K101E/H/P, V106I, E138A/G/K/Q/R, V179D/F/L/T, Y181C/I/V, G190A/S, H221Y, F227C and M230I/L) to determine the genetic barrier for these drugs. A total of 267 sequences were analysed (136 from subtype B and 131 from subtype CRF02_AG). Overall, analysis of these sequences showed 37 wild-type codons encoding for the expected wild-type amino acids in the HXB2 reference sequence at 12 amino acid positions (Table 1).

At each position, we always found a predominant codon that represented >73% of the population, except at position 98 for subtype CRF02_AG, where the predominant codon GCG accounted for 63.3%. The majority (7/12) of studied amino acid positions (100, 101, 106, 138, 190, 221 and 230) were conserved between HIV-1 subtypes CRF02_AG and B, leading to a similar genetic barrier. The smallest number of transitions and transversions required for a RAM to a particular drug was evaluated at each codon of the positions described above. To calculate the genetic barrier from each wild-type codon, the mutated codon corresponding to the minimal score between transition or/and transversion was chosen (Table 1). Scores of 1, 2, 2.5, 3.5 or 5 were calculated according to the amino acid substitution for all positions, independently of subtype (Figure 1).

Different predominant codons between subtypes B and CRF02_AG were observed in 5/12 positions (90, 98, 179, 181 and 227). Briefly, these were: for position 90, the codons GTC/GTT for subtype CRF02_AG/subtype B; for position 98, the codons GCG/GCA for subtype CRF02_AG/subtype B; for position 179, the codons GTG/GTT for subtype CRF02_AG/subtype B; for position 181, the codons TAC/TAT for subtype CRF02_AG/subtype B; and for position 227, the codons TTT/TTC for subtype CRF02_AG/subtype B (Table 1). However, these differences had an effect on the calculated genetic barrier only at position 179. For the V179D substitution, a majority of subtype CRF02_AG sequences required one transition plus one transversion to substitute GTG with GAC, compared with subtype B, which required only a single transversion to evolve from GTT with GAT. For the V179F substitution, a majority of subtype CRF02_AG sequences required two transversions to substitute GTG with TTT, compared with B subtypes that required only a single transversion to evolve from GTT to TTT. In summary, the genetic barrier was higher for subtype CRF02_AG than subtype B for the V179D mutation (a score of 2.5 versus 3.5, respectively) and for the V179F mutation (2.5 versus 5, respectively) (Figure 1). These mutations have been implicated in etravirine resistance. Considering the IAS 2011 list of mutations, the genetic barrier was the same between subtype B and subtype CRF02_AG at all positions implicated in rilpivirine resistance.

Discussion

The variability at nucleotide level between the different HIV-1 subtypes could have an effect on the genetic barrier, which is an important factor contributing to the development of drug resistance. This study is the first to compare the genetic barrier to second-generation NNRTIs (etravirine and rilpivirine) between subtypes B and CRF02_AG.

Overall, the majority of amino acid positions (7/12) involved in etravirine and rilpivirine resistance (100, 101, 106, 138, 190, 221 and 230) showed a high degree of conservation of the predominant codons between the B and CRF02_AG subtypes. These results suggest a similar genetic barrier between the two subtypes. Van de Vijver *et al.*[14] have shown similar results in their study on protease inhibitor, NRTI and NNRTI (only nevirapine and efavirenz) classes. Indeed, the calculated genetic barrier was the same between nine different subtypes in terms of the majority of RAMs except for a few minor protease substitutions. Other studies on integrase

Figure 1. Comparison of the genetic barrier in reverse transcriptase (RT) for etravirine (ETV) and rilpivirine (RPV) between HIV-1 subtype CRF02_AG (left) and subtype B (right). The frequency of each codon is represented by bars at positions related to ETV and RPV resistance mutations. The minimal calculated score for each corresponding codon is represented by a colour code. Mutations with different calculated genetic barriers between subtypes CRF02_AG and B are shown in bold. (a) From mutation position 90 to 138. (b) From mutation position 179 to 230.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 30, 2014

inhibitors have also shown same degree of predominant codon conservation.[15,16]

In our study, in 5/12 positions, the predominant codons were different between B and CRF02_AG subtypes. The substitutions related to positions 90, 98, 181 and 227 did not lead to a different genetic barrier. However, position 179 presented a different genetic barrier, particularly for substitutions V179D and V179F, which showed a higher score for subtype CRF02_AG. Similarly, Maiga *et al.*[15] have also shown, but only on the integrase gene, a few differences in the genetic barrier between the B and CRF02_AG subtypes, with a higher score for subtype CRF02_AG. Moreover, a higher genetic barrier was frequently found in non-B subtypes compared with the B subtype.[14] Indeed, a mutation at position 179 is important for etravirine resistance. *In vitro* studies have shown that mutations V179D and V179F were selected by etravirine and reduced susceptibility to it.[17,18] *In vivo*, studies such as DUET have also shown a selection of 179D or 179F in cases of failure of etravirine therapy.[6] Moreover, Marcelin *et al.*[19] have shown that, in cases of etravirine failure, 2/3 selected mutations were V179I or V179F. Thus, all these studies have suggested that mutations V179D and V179F are involved in etravirine resistance. Furthermore, in a study of the prevalence of etravirine RAMs in ARV-naive patients with CRF02_AG subtype viruses, the V179D and V179F mutations were absent.[20] This could be explained by the higher genetic barrier of the subtype CRF02_AG at this position, as we have shown.

In summary, most of the amino acid positions showed a high level of conservation of the predominant codon sequence, indicating a similar genetic barrier in the B and CRF02_AG subtypes. There was no effect of a genetic barrier at positions associated with rilpivirine resistance. However, the CRF02_AG subtype had a higher genetic barrier for the etravirine RAMs V179D and V179F compared with the B subtype. These results suggest that it would be more difficult for subtype CRF02_AG viruses to become resistant to etravirine. These findings are important for the clinical management of patients with CRF02_AG subtype viruses, and it would be interesting to study the genetic barrier for other subtypes such as subtype C.

Acknowledgements

We thank G. Le Mallier and P. Grange for their technical assistance.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'—(grant agreement no. 223131) and ARVD (Association de Recherche en Virologie et Dermatologie).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Thompson MA, Aberg JA, Cahn P *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2010; **304**: 321–33.

2 Ghosn J, Chaix M-L, Delaugerre C. HIV-1 resistance to first- and second-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 2009; **11**: 165–73.

3 Department of Health and Human services. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf?bcsi_scan_CBA24F92DB3F63E2=0&bcsi_scan_filename=adultandadolescentgl.pdf (21 May 2013, date last accessed).

4 Andries K, Azijn H, Thielemans T *et al.* TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4680–6.

5 Lazzarin A, Campbell T, Clotet B *et al.* Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2007; **370**: 39–48.

6 Madruga JV, Cahn P, Grinsztejn B *et al.* Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2007; **370**: 29–38.

7 Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF *et al.* 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* **19**: 156–64.

8 Sanford M. Rilpivirine. *Drugs* 2012; **72**: 525–41.

9 Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* 2011; **378**: 238–46.

10 Vingerhoets J, Rimsky L, Van Eygen V *et al.* Preexisting mutations in the rilpivirine Phase III trials ECHO and THRIVE: prevalence and impact on virologic response. *Antivir Ther* 2013; **18**: 253–6.

11 Anta L, Llibre JM, Poveda E *et al.* Rilpivirine resistance mutations in HIV patients failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapies. *AIDS* 2013; **27**: 81–5.

12 Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J *et al.* TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 718–27.

13 Gotte M. The distinct contributions of fitness and genetic barrier to the development of antiviral drug resistance. *Curr Opin Virol* 2012; **2**: 644–50.

14 van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G *et al.* The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **41**: 352–60.

15 Maiga AI, Malet I, Soulie C *et al.* Genetic barriers for integrase inhibitor drug resistance in HIV type-1 B and CRF02_AG subtypes. *Antivir Ther* 2009; **14**: 123–9.

16 Nguyen HL, Ruxrungtham K, Delaugerre C. Genetic barrier to the development of resistance to integrase inhibitors in HIV-1 subtypes CRF01_AE and B. *Intervirology* 2012; **55**: 287–95.

17 Asahchop EL, Oliveira M, Wainberg MA *et al.* Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 600–7.

18 Lai MT, Lu M, Felock PJ *et al.* Distinct mutation pathways of non-subtype B HIV-1 during in vitro resistance selection with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4812–24.

19 Marcelin AG, Descamps D, Tamalet C *et al.* Emerging mutations and associated factors in patients displaying treatment failure on an etravirine-containing regimen. *Antivir Ther* 2012; **17**: 119–23.

20 Maiga AI, Descamps D, Morand-Joubert L *et al.* Resistance-associated mutations to etravirine (TMC-125) in antiretroviral-naive patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 728–33.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 30, 2014

ARTICLE 5.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014

Genetic Barrier for Attachment Inhibitor BMS-626529 resistance in HIV-1 B and non B subtypes

Djeneba Bocar Fofana, Charlotte Charpentier, Amoustapha Issiaka Maiga, Sidonie Lambert-Niclot, Sophie Sayon, Nathalie Désiré, Anne Simon, YazdanYazdanpanah, Christine Katlama, Diane Descamps, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin et Cathia Soulié

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published September 30, 2014

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dku360

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Genetic barrier for attachment inhibitor BMS-626529 resistance in HIV-1 B and non-B subtypes

Djeneba B. Fofana[1–3], Charlotte Charpentier[4–6], Almoustapha I. Maïga[7,8], Sidonie Lambert-Niclot[1–3], Sophie Sayon[1–3], Nathalie Désiré[1–3], Anne Simon[9], Yazdan Yazdanpanah[4,5,10], Christine Katlama[1,2,11], Diane Descamps[4–6], Vincent Calvez[1–3], Anne-Geneviève Marcelin[1–3] and Cathia Soulié[1–3]*

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; [2]INSERM, UMR_S 1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, F-75013 Paris, France; [3]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Virologie, F-75013 Paris, France; [4]IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France; [5]IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France; [6]AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, laboratoire de Virologie, F-75018 Paris, France; [7]Unité d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance du VIH, SEREFO-FMOS/FAPH, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali; [8]Service de Laboratoire, CHU Gabriel Toure, Université des Sciences Techniques et des Technologies, Bamako, Mali; [9]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de médecine interne, F-75013 Paris, France; [10]AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Service de maladies infectieuses, F-75018 Paris, France; [11]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de maladies infectieuses, F-75013 Paris, France

*Corresponding author. Laboratoire de Virologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 45-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013, Paris, France. Tel: +33-1-42175844; Fax: +33-1-42177411; E-mail: cathia.soulie@psl.aphp.fr

Received 2 June 2014; returned 20 July 2014; revised 8 August 2014; accepted 14 August 2014

Objectives: The genetic barrier (defined as the number of genetic transitions/transversions needed to produce a resistance mutation) can differ between HIV-1 subtypes. The genetic barrier for the new attachment inhibitor BMS-626529 was evaluated in five HIV-1 subtypes.

Methods: Nine substitutions associated with BMS-626529 resistance at seven amino acid positions (116, 204, 375, 426, 434, 475 and 506) were analysed in 300 nucleotide sequences of the *env* gene encoding the gp120 protein from antiretroviral-naive patients (60 for each subtype and recombinant: B, C, D, CRF01_AE and CRF02_AG).

Results: Differently from the B subtype, some resistance mutations were found as natural polymorphisms in the C and D subtypes and the CRF02_AG and CRF01_AE recombinants for four positions of the *env* gene encoding the gp120 protein (375, 426, 434 and 475). The majority (five out of seven) of amino acid positions studied (116, 426, 434, 475 and 506) were relatively conserved (>63%) between the five HIV-1 subtypes, leading to a similar genetic barrier to mutations associated with resistance to BMS-626529. However, at positions 116 and 506 a minority of C and CRF02_AG subtypes had codons leading to a higher genetic barrier. Different predominant codons were observed at two out of seven positions (204 and 375) between the subtypes, with no effect on the calculated genetic barrier. However, for position 375, a minority of CRF02_AG sequences showed a lower genetic barrier to S375M/T resistance mutations.

Conclusions: In non-B HIV-1 subtypes, four out of seven studied positions presented mutations implicated in BMS-626529 resistance. Despite great variability of the HIV-1 envelope, there was no major impact of polymorphisms on the genetic barrier to acquisition of BMS-626529 resistance.

Keywords: HIV, drug resistance, antiviral

Introduction

In HIV treatment, attachment inhibitors (AIs) represent a novel class of entry inhibitors. The BMS-626529 (prodrug BMS-663068) AI binds to the HIV-1 envelope glycoprotein gp120, preventing viral entry into host cells by inhibiting the interaction between the virus and the cellular receptor CD4.[1] In a recent Phase II clinical trial, the BMS-663068 AI, in combination with raltegravir and tenofovir, showed favourable safety and tolerability profiles with similar efficacy in comparison with atazanavir/ritonavir up to week 24 in treatment-experienced patients.[2]

Some *in vitro* studies showed that BMS-626529 demonstrated activity against most subtypes.[3] However, a differential antiviral activity of this drug showed the possibility of natural resistance for CRF01_AE recombinant and HIV-1 group O.[3] *In vitro* passage experiments evidenced substitutions in the CD4 binding site in

© *The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014

HIV gp120 that confer resistance to BMS-626529 (L116P, A204D, M426L, M434I-V506M and M475I).[3] In an *in vivo* study in which BMS-626529 in its prodrug form was administered as monotherapy for 8 days to patients infected with HIV-1 B subtypes, the *env* substitution M426L was found to be strongly associated with low susceptibility to BMS-626529. S375T, M434I and M475I may contribute to loss of phenotypic susceptibility in some non-responders.[4] Overall, the data suggested that susceptibility to BMS-626529 was highly variable and a clinical cut-off has not yet been determined.[4]

The study of the genetic barrier helps in the understanding of genetic variations between different HIV subtypes, especially their ability to develop resistance mutations. Previous studies have evaluated the genetic barrier between different subtypes for other therapeutic classes, such as NRTIs, NNRTIs, PIs and integrase inhibitors (INIs).[5–8] However, there are few data on the HIV envelope, which is characterized by high genetic variability. In this study, the genetic barrier, defined as the number of genetic variations needed to produce a resistance mutation to BMS-626529 AI, was evaluated for five HIV-1 subtypes: B versus non-B (C, D, CRF02_AG and CRF01_AE).

Methods

Three-hundred sequences of the *env* gene encoding the gp120 protein (60 for each B, C and D subtype; 60 for each CRF02_AG and CRF01_AE recombinant) from antiretroviral-naive patients were analysed. All sequences for C, D, CRF01_AE subtypes and 30 sequences for CRF02_AG were collected from the Los Alamos database.[9] Sequences for all B and 30 sequences for CRF02_AG subtypes were collected from the database of Pitié-Salpêtrière and Bichat Hospitals.

Analysis of sequences was performed using the previously published method.[8] In summary, transitions were defined by the replacement of a purine by another purine (A↔G) or of a pyrimidine by another pyrimidine (C↔T) and transversions were defined by the replacement of a purine by a pyrimidine and *vice versa* A↔C A↔T G↔C G↔T.[7] For the calculation of the genetic barrier, the smallest number of transitions T (scored as 1) and/or transversions V (scored as 2.5) required for evolution to BMS-626529 AI resistance-associated mutations was used.

Seven amino acid positions at which there were nine substitutions conferring resistance to BMS-626529 were explored: L116P, A204D, S375H/M/T, M426L, M434I, M475I and V506M.

Results

In order to compare the genetic barrier to BMS-626529 AI resistance between five different HIV-1 recombinants and subtypes (B, C, D, CRF02_AG and CRF01_AE), a total of 300 sequences of the *env* gene encoding the gp120 protein (60 sequences for each subtype) were evaluated at seven positions.

Primary resistance to BMS-626529 AI was observed in this population of 300 sequences from antiretroviral-naive patients for four positions of the *env* gene encoding the gp120 protein (375, 426, 434 and 475) (Table 1). The S375H and S375T mutations were detected in 100% of the CRF01_AE recombinant and 9% of the D subtype sequences, respectively. For CRF02_AG recombinant and C and D subtypes, M426L was observed in 2%, 6% and 25% of sequences, respectively. The M434I substitution was present in 5%, 7% and 13% of sequences of the C, CRF01_AE and CRF02_AG subtypes, respectively. The M475I substitution was observed in 88% of the CRF01_AE recombinants. No primary resistance mutation was observed in the B subtype. Neither L116P nor A204D was observed in any subtype.

The majority (five out of seven) of amino acid positions studied were relatively conserved between the HIV-1 subtypes and recombinants, leading to a similar genetic barrier to mutations associated with resistance to BMS-626529 AI: >63% had CTA at position 116, >75% had ATG at position 426, >80% had ATG at position 434, >97% had ATG at position 475 (except the CRF01_AE sequences, of which 88% presented natural polymorphisms leading to resistance) and >77% had GTG at position 506. However, at position 116, 25% of C subtype sequences and 33% of CRF02_AG recombinant sequences showed other codons, leading to a higher genetic barrier (minimal score 2 for TTA versus 1 for CTA) (Table 1 and Figure 1). At position 506, the CRF02_AG recombinant showed a higher genetic barrier in 23% of sequences (minimal score 6 for GGT versus 1 for GTG) (Table 1 and Figure 1).

At the two remaining positions (204 and 375), different predominant codons were observed. At position 204, two codons were predominant: GCC for the B and C subtypes and GCT for the CRF02_AG recombinant, the CRF01_AE recombinant and the D subtype. However, these two codons showed a similar minimal score of 2.5 for BMS-626529 AI resistance mutations. At position 375, two codons were also predominant (AGT for subtype B and CRF02_AG recombinant and AGC for subtypes C and D). These codons had similar minimal scores for the considered mutations (H, M and T). It should be noted that 25% of CRF02_AG recombinants had the ATT codon, leading to a lower minimal score for two mutations in comparison with the predominant codon (2.5 versus 5 for M; 1 versus 2.5 for T) (Table 1 and Figure 1).

Discussion

In the development of drug resistance, the genetic barrier is an important factor that may be influenced by high genetic diversity of HIV. In this study, the genetic barrier to the new BMS-626529 AI was explored for the first time for five different subtypes and recombinants (B, C, D, CRF02_AG and CRF01_AE). The majority of the studied amino acid positions (116, 426, 434, 475 and 506) were relatively conserved between HIV-1 subtype B and other studied subtypes, leading to a similar genetic barrier to BMS-626529 AI resistance mutations. Indeed, none of the studied subtypes was more susceptible to the acquisition of resistance mutations to BMS-626529 AI. However, this genetic barrier could be slightly different for a minority of CRF02_AG and C sequences, depending on the naturally present codon (the barrier is higher or lower depending on the amino acid position).

Despite the high variability of the HIV envelope, the genetic barrier was similar for most codons between different subtypes and recombinants (B, C, D, CRF02_AG, CRF01_AE) for BMS-626529 AI resistance mutations. This result could be related to the fact that most substitutions identified previously in BMS-378806- and BMS-488043-resistant viruses mapped to the conserved regions (C1, C2, C4 and C5) of the HIV-1 envelope.[4] Several other studies showed globally a high degree of conservation for different antiretroviral classes (NRTIs, NNRTIs, PIs and INIs), leading to a similar genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions.[5–8] However, in the non-B subtypes, particularly the CRF02_AG recombinant in comparison with the B subtype, a high genetic barrier was observed at only a few positions, such

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014

Table 1. Evaluation of the genetic barrier defined by the number of transitions (T) or transversions (V) required to obtain mutated codons conferring resistance to BMS-626529 in different subtypes of HIV-1

gp120 codon position	Substitution[a]	Codon	Codon (%) subtype B	subtype C	subtype D	recombinant CRF02_AG	recombinant CRF01_AE	Mutational resistance codon[a,b]	Minimal score[c]
116	**L116P**	CTA[d]	100	75	75	63	100	*CCT* 1T.1V *CCC* 1T.1V *CCA* 1T *CCG* 2T	1
		TTA	0	25	0	33	0	2T.1V 2T.V 2T 3T	2
		CTC	0	0	25	0	0	2T.1V 2T.1V 3T 2T	2
		CTG	0	0	0	4	0	1T.1V 1T.1V 2T 1T	1
204	**A204D**	GCT	0	2	67	97	93	*GAT* 1V *GAC* 1V.1T	2.5
		GCC[d]	100	98	0	3	7	2V.1T 1V	2.5
		GCG	0	0	33	0	0	2V 2V	5
375	**S375T**	AGT[d]	100	28	8	75	0	ACT 1V ACC 1T.1V ACA 2V ACG 2V	2.5
		AGC	0	72	83	0	0	ACT 1T.1V ACC 1V ACA 2V ACG 2V	2.5
	H375T	CAT	0	0	0	0	100	ACT 2V ACC 1T.2V ACA 3V ACG 3V	5
	I375T	ATT	0	0	0	25	0	ACT 1T ACC 2T ACA 1T.1V ACG 1T.1V	1
	T375T	ACC	0	0	9	0	0	ACT 1T ACC 0 ACA 1V ACG 1V	0
	S375M	AGT[d]	100	28	8	75	0	ATG 2V	5
		AGC	0	72	83	0	0	ATG 2V	5
	H375M	CAT	0	0	0	0	100	ATG 3V	7.5
	I375M	ATT	0	0	0	25	0	ATG 1V	2.5
	T375M	ACC	0	0	9	0	0	ATG 1T.1V	3.5
	S375H	AGT[d]	100	28	8	75	0	CAT 1T.1V CAC 1V.2T	3.5
		AGC	0	72	83	0	0	CAT 2T.1V CAC 1T.1V	3.5
	H375H	CAT	0	0	0	0	100	CAT 0 CAC 1T	0
	I375H	ATT	0	0	0	25	0	CAT 2V CAC 1T.2V	3.5
	T375H	ACC	0	0	9	0	0	CAT 1T.2V CAC 2V	5
426	**M426L**	ATG[d]	100	92	75	97	100	*TTA* 1V.1T *TTG* 1V *CTT* 2V *CTC* 2V *CTA* 1V.1T *CTG* 1V	2.5
	L426L	CTG	0	6	25	2	0	*TTA* 2T *TTG* 1T *CTT* 1V *CTC* 1V *CTA* 1T *CTG* 0	0
	P426L	CCA	0	0	0	1	0	*TTA* 2T *TTG* 3T *CTT* 1T.1V *CTC* 1T.1V *CTA* 1T *CTG* 2T	1
	I426L	ATA	0	2	0	0	0	*TTA* 1V *TTG* 1T.1V *CTT* 2V *CTC* 2V *CTA* 1V *CTG* 1T.1V	2.5
434	**M434I**	ATG[d]	100	95	90	80	93	*ATT* 1V *ATC* 1V *ATA* 1T	1
	I434I	ATA	0	5	0	13	7	*ATT* *1V* *ATC* 1V *ATA* 0	0
	T434I	ACG	0	0	0	7	0	*ATT* *1T1V* *ATC* 2V *ATA* 2T	2
	V343I	GTG	0	0	10	0	0	*ATT* 1T.1V *ATC* 1T.1V *ATA* 2T	2
475	**M475I**	ATG[d]	100	97	100	100	12	*ATT* 1V *ATC* 1V *ATA* 1T	1
	I475I	ATA	0	0	0	0	88	1V 1V 0	0
	T475I	ACG	0	3	0	0	0	*ATT* 1T.1V *ATC* 2V *ATA* 2T	2
506	**V506M**	GTG[d]	100	100	100	77	100	*ATG* 1T	1
	G506M	GGT	0	0	0	23	0	ATG 1T.2V	6

[a]Resistance mutation codons are shown in italics and mutation positions are shown in bold.
[b]The number of transitions (T) or transversions (V) or the sum of both, required to calculate the score for the genetic barrier.
[c]The minimal score was taken for each codon with a single transition (score 1) and single transversion (score 2.5). Only the codons present in our sequences are shown in this table.
[d]Wild-type codon in HxB2.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014

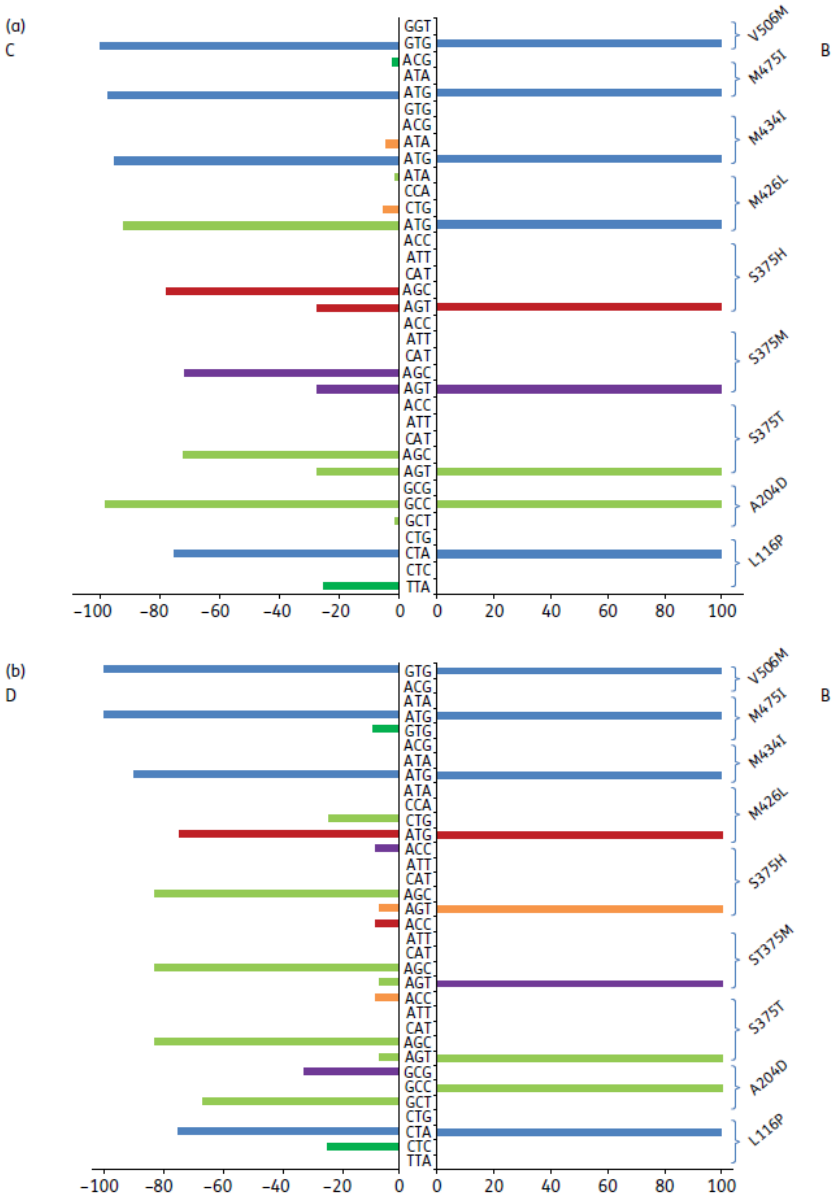


Figure 1. Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to BMS-626529 between different subtypes. The minimal score for the genetic barrier calculated for each codon is shown by a colour code (yellow, 0; dark blue, 1; dark green, 2; light green, 2.5; red, 3.5; purple, 5; light blue, 6). The frequency of each codon is represented by bars at positions associated with BMS-626529 resistance mutations. (a) Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to BMS-626529 between HIV-1 subtypes C (left) and B (right). (b) Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to BMS-626529 between HIV-1 subtypes D (left) and B (right). (c) Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to BMS-626529 between HIV-1 recombinant CRF02_AG (left) and subtype B (right). (d) Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to BMS-626529 between HIV-1 recombinant CRF01_AE (left) and subtype B (right). This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014

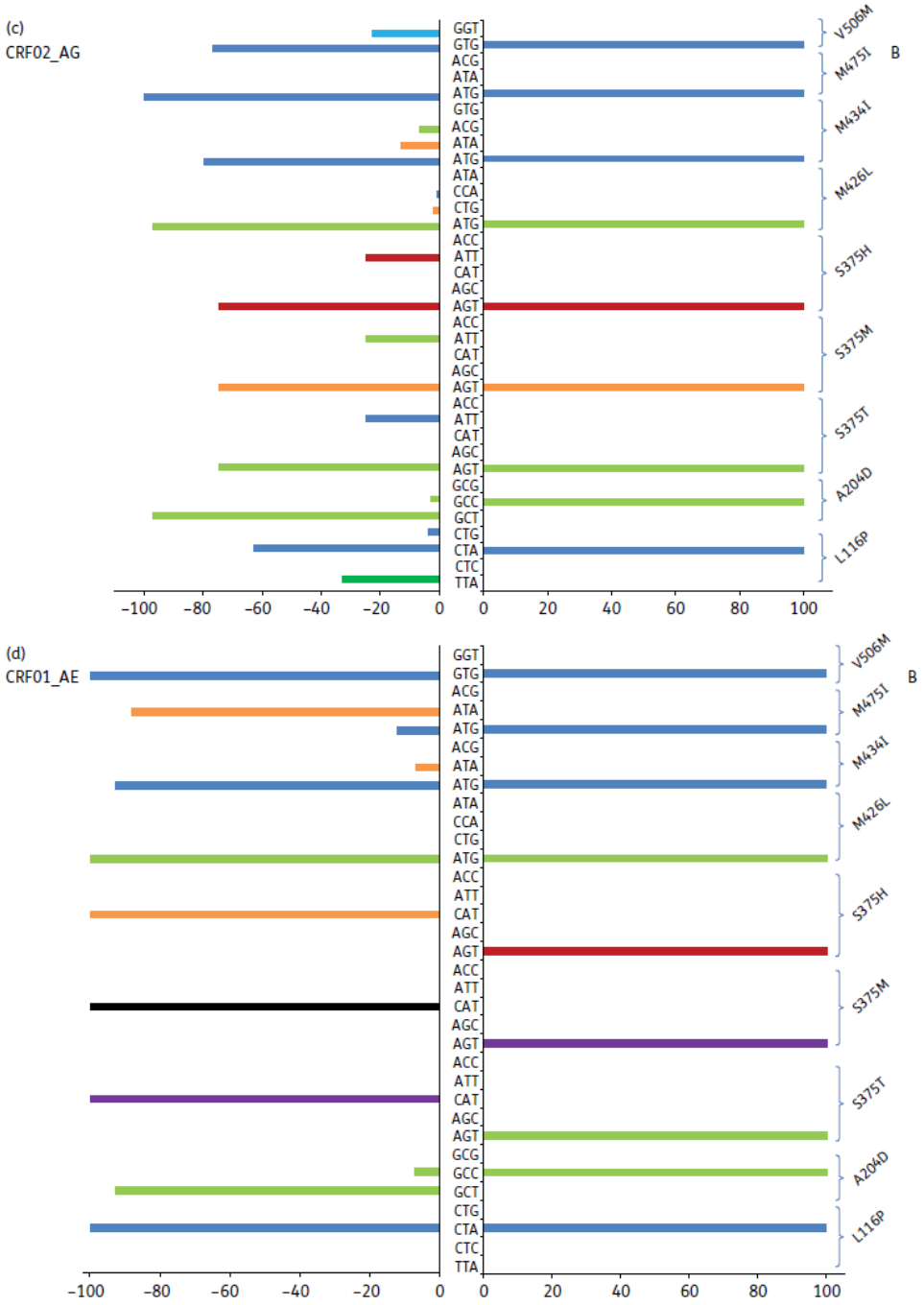


Figure 1. *Continued*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014

as G140S, G140C and V151I in the integrase gene, which could play a role in resistance to raltegravir or elvitegravir.[6] Similarly, a higher genetic barrier for V179D and V179F in the reverse transcriptase gene was observed, suggesting that it would be more difficult to produce resistance to etravirine in the CRF02_AG recombinant than in the B subtype.[5] Furthermore, in our study, the CRF02_AG recombinant showed a higher genetic barrier at positions 116 and 506, suggesting greater difficulty for this subtype to acquire BMS-626529 AI resistance mutations at those positions. A similar result was observed with subtype C at position 116.

We confirm that previously described mutations associated with resistance to BMS-626529 AI can exist naturally in sequences from naive patients.[3,4,10–12] This has been shown for the CRF01_AE recombinant, which harboured S375H in 100%, M434I in 7% and M475I in 88% of the sequences and to a lesser extent for the C subtype (M426L 6%, M434I 5%), D subtype (S375T 9%, M426L 25%) and CRF02_AG recombinant (M426L 2%, M434I 13%). Class resistance in CRF01_AE recombinant viruses was previously mapped to the 375H and 475I substitutions, found in the vast majority of the viruses.[4] M426L appeared at a frequency of 3.3% in CRF02_AG recombinants studied in a previous analysis and the overall frequency of the M434I substitution is 8% of all isolates in the LANL database and 15.4% of CRF02_AG recombinants.[4] *In vitro*, BMS-626529 displayed activity against almost all subtypes tested, with the B subtype appearing to be most susceptible, followed by subtype C. Only the CRF01_AE recombinant was not susceptible to BMS-626529 *in vitro*, which can probably be explained by the presence of natural polymorphism.[3]

In summary, a similar genetic barrier at positions associated with BMS-626529 AI resistance in different subtypes and recombinants was observed despite the known great variability of the HIV envelope. However, a minority of CRF02_AG and C sequences had a higher genetic barrier, suggesting that it would be more difficult for these recombinants and subtypes to acquire mutations at those positions. The development of resistance to BMS-626529 in clinical trials should be carefully studied, taking into account the subtype.

Acknowledgements

We thank G. Le Mallier for technical assistance.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'—(grant agreement n° 223131) and the Association de Recherche en Virologie et Dermatologie (ARVD).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Ho HT, Fan L, Nowicka-Sans B *et al.* Envelope conformational changes induced by human immunodeficiency virus type 1 attachment inhibitors prevent CD4 binding and downstream entry events. *J Virol* 2006; **80**: 4017–25.

2 Lalezari J, Latiff GH, Brinson CJ *et al.* Attachment inhibitor prodrug BMS-663068 in ARV-experienced subjects: week 24 analysis. In: *Abstracts of the Twenty-first Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2014*. Abstract 86. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.

3 Nowicka-Sans B, Gong YF, McAuliffe B *et al.* In vitro antiviral characteristics of HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 3498–507.

4 Zhou N, Nowicka-Sans B, McAuliffe B *et al.* Genotypic correlates of susceptibility to HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active agent of the prodrug BMS-663068. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 573–81.

5 Fofana DB, Soulie C, Maiga AI *et al.* Genetic barrier to the development of resistance to rilpivirine and etravirine between HIV-1 subtypes CRF02_AG and B. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2515–20.

6 Maiga AI, Malet I, Soulie C *et al.* Genetic barriers for integrase inhibitor drug resistance in HIV type-1 B and CRF02_AG subtypes. *Antivir Ther* 2009; **14**: 123–9.

7 Nguyen HL, Ruxrungtham K, Delaugerre C. Genetic barrier to the development of resistance to integrase inhibitors in HIV-1 subtypes CRF01_AE and B. *Intervirology* 2012; **55**: 287–95.

8 van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G *et al.* The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **41**: 352–60.

9 HIV Sequence Database. http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html.

10 Charpentier C, Larrouy L, Visseaux B *et al.* Prevalence of subtype-related polymorphisms associated with in vitro resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in HIV-1 'non-B'-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1459–61.

11 Schader SM, Colby-Germinario SP, Quashie PK *et al.* HIV gp120 H375 is unique to HIV-1 subtype CRF01_AE and confers strong resistance to the entry inhibitor BMS-599793, a candidate microbicide drug. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4257–67.

12 Soulie C, Lambert-Niclot S, Fofana DB *et al.* Frequency of amino acid changes associated with resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in R5- and X4-tropic HIV-1 subtype B. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1243–5.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 30, 2014