

## Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARN <sub>t3</sub> <sup>Lys</sup>	ARN de transfert de la lysine
ARV	Antirétroviral
CCR5	<i>CC chemokine Receptor type 5</i> , récepteur de chimiokines 5
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> , protéine de différentiation 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> , protéine de différentiation 8
CDK9	<i>Cyclin-dependent kinase 9</i> , kinase dépendante de la cycline 9
CDC	<i>Center for diseases control</i> , centre de surveillance des maladies
CI50/ CI90	Concentration inhibitrice de 50%/90% de la réplication virale
CNLS	Conseil National de lutte contre le SIDA et les IST
CRF	<i>Circulating recombinant form</i> , forme recombinante circulante
CXCR4	<i>CXC chemokine receptor type 4</i> , récepteur de chimiokines 4
Cyc T1	Cycline T1
DBS	Dry Blood Spot (spot de sang séché)
DIS	<i>Dimerization Signal</i> (signal de dimérisation)
DLSI	Division de lutte contre le SIDA et les IST
dNTP	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
ddNTP	2', 3'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
<i>env</i>	<i>envelope</i> , gène codant pour les protéines de l'enveloppe
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>gag</i>	<i>group-specific antigen</i> , gènes des antigènes de groupe codant pour la matrice, la capsid et la nucléocapsid
gp	Glycoprotéine
gp120SU ou gp120	Glycoprotéine de surface de 120 kDa

gp125	Glycoprotéine de 125 kDa
gp36	Glycoprotéine de 36 kDa
gp41TM ou gp41	Glycoprotéine transmembranaire 41 kDa
HAART	Highly active antiretroviral therapy, traitement ARV hautement actif
HLA	Human Leucocyte Antigen, antigène leucocytaire humain
HMA	Heteroduplex Mobility Assay, test de mobilité des hétéroduplex
HR1/HR2	Heptad Repeat Region 1/2, region répétée heptapeptidique
IF	Inhibiteur de Fusion
IN	Intégrase
INI	Inhibiteur de l'intégrase
INTI	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INNTI	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP	Inhibiteurs de Protéase
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISAARV	Initiative sénégalaise d'accès aux antirétroviraux
IST	Infections Sexuellement Transmissibles
kDa	Kilodalton
LAV	<i>Lymphadenopathy associated virus</i> , virus associé aux lymphadénopathies
LBV	Laboratoire de Bactériologie-Virologie
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> , séquences longues terminales répétées
MHA	<i>Multi Hybridization Assay</i> , test d'hybridation multi région
<i>nef</i>	<i>Negative Expression Factor</i> , facteur d'expression négative codant la protéine Nef
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> , signal de localisation nucléaire
NSE	<i>Nuclear Export Signal</i> , signal d'exportation nucléaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
P17 MA ou MA	Protéine de matrice de 17kDa
P24 CA ou CA	Protéine de capsid de 24kDa
P31 IN ou IN	Protéine intégrase de 31kDa

P7 NC ou NC	Protéine ribonucléoprotéique de 7kDa
p51	Sous-unité de la TI de 51 kDa
p66	Sous-unité de la TI de 66 kDa
pb	Paire de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	<i>Primer Binding Site</i> , site de liaison de l'amorce ARN <sub>t</sub> <sup>Lys</sup>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction d'amplification par polymérisation en chaîne
PIC	Pre-Integration Complex
<i>pol</i>	<i>Polymerase</i> , gène <i>pol</i> codant les enzymes virales
polyA	Polyadenylation signal, signal de polyadénylation
PR	Protéase
Pr160Gag-Pol	Polyprotéine Gag –Pol
Pr55 <sup>Gag</sup>	Polyprotéine Gag
PvVIH	Personnes vivant avec le VIH
QIG	Quotient d'inhibition génotypique
RE	Réticulum Endoplasmique
RNase H	<i>Ribonuclease H</i> , enzyme de dégradation de l'ARN
<i>rev</i>	<i>Regulator of Expression Virus</i> , gène régulateur de l'expression des virus codant la protéine Rev
RRE	<i>Rev Responsive Element</i> ; site de liaison de la protéine Rev sur l'ARN viral
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> , virus de l'immunodéficience simienne
SIVcpz	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> of chimpanzee, virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé
SIVsmm	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> of mangabey, virus de l'immunodéficience simienne du mangabey
SIVgor	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> of gorilla, virus de l'immunodéficience simienne du gorille
SP1	Specificity protein 1
TAM	thymidine analogue mutations, mutations associées aux analogues de la thymidine

TAR	trans-activation responsive region, région de transactivation par TAT
TARV	traitement antiretroviral
<i>tat</i>	trans-activator of transcription, gène transactivateur de la transcription codant la protéine Tat
TI	Transcriptase inverse, reverse transcriptase
URF	unique recombinant form, forme recombinante unique
<i>vif</i>	virion infectivity factor, facteur d'infectivité viral codant pour la protéine Vif
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	VIH de type 1
VIH-2	VIH de type 2
<i>vpr</i>	viral protein R, gène codant la protéine virale R
<i>vpu</i>	viral protein U, gène codant la protéine virale U
<i>vpx</i>	viral protein X, gène codant la protéine virale X

## Liste des acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
O	Pyl	Pyrrrolysine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
U	Sec	Sélénocystéine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Trente années après la découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la pandémie du « syndrome d'immunodéficience acquise » (SIDA) se poursuit, en particulier dans les pays en développement. Le SIDA, décrit pour la première fois en 1981, est la conséquence grave de l'infection par le VIH, responsable d'une diminution de l'immunité cellulaire qui est source d'infections opportunistes. L'amélioration des fonctions immunitaires sous traitement antirétroviral (TARV) a permis de réduire de façon considérable le nombre de décès liés à l'infection (Mahy *et al.*, 2010).

L'infection par le VIH réalise une pandémie, dont la transmission par voie sexuelle est la plus fréquente. A la fin de l'année 2011, il existait près de 34 millions de personnes infectées dans le monde. L'Afrique Subsaharienne restait l'une des régions les plus gravement touchées avec près d'un adulte sur 20 (4,9%) vivant avec le VIH, ce qui représentait 69% des personnes infectées (ONUSIDA, 2012).

Les enfants ne sont pas épargnés par cette pandémie. Selon les dernières estimations, 3,4 millions d'enfants de moins de 15 ans vivaient avec le VIH en 2010 (OMS 2011), et 90% de ces enfants vivaient en Afrique Sub-saharienne (ONUSIDA, 2010). La grande majorité des enfants séropositifs pour le VIH sont infectés verticalement. En 2011, 330 000 enfants ont été infectés par le VIH. Cela représente une baisse de 43 % depuis 2003 et une baisse de 24 % depuis 2009 (ONUSIDA, 2012). Ces résultats encourageants sont la conséquence des efforts déployés à l'échelle mondiale, ayant pour objectif l'élimination de la transmission mère enfant (TME) du VIH d'ici à 2015. Cependant, malgré les efforts consentis, il existe encore des enfants qui naissent infectés par le VIH. Le taux de mortalité reste élevé chez ces enfants infectés, dans les premiers mois de vie à l'absence d'une bonne prise en charge incluant le TARV et la prophylaxie au co-trimoxazole. Un taux de 30% des enfants infectés meurent durant la première année de vie et 50% ne survivent pas jusqu'à l'âge de deux ans à défaut d'une bonne prise en charge (Newell M L *et al.*, 2004).

Il existe pourtant un réel bénéfice de survie si les enfants infectés ont accès à un diagnostic précoce et une prise en charge thérapeutique adéquate (Russell B *et al* 2011 ; Goetghebuer T *et al.*, 2009 ; Violari A *et al.*, 2008 ; Faye A *et al.*, 2004). Dans les pays en voie de développement, seulement 15% des enfants exposés ont accès au diagnostic précoce, et rien que 28% des enfants éligibles pour le traitement, reçoivent des antirétroviraux (ARV) (ONUSIDA, 2012). Un des facteurs expliquant cette couverture du TARV réduite, est le faible taux de diagnostic. Chez les enfants de moins de 18 mois, ce diagnostic de l'infection à

VIH nécessite des méthodes virologiques, à la place des tests sérologiques conventionnels comme chez les adultes, à cause de la présence des anticorps maternels. Cela fait intervenir des tests basés sur des techniques de polymérisation en chaîne (PCR) visant à détecter le matériel génétique viral.

La détection de l'acide désoxyribonucléique (ADN) proviral du VIH est la technique de référence. Il est possible également d'utiliser des techniques détectant l'acide ribonucléique (ARN), mais elles sont plus souvent utilisées pour la détermination de la charge virale circulante.

Le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois a débuté au Sénégal en 2000. Après une phase pilote, le passage à l'échelle a permis de mener le diagnostic précoce au niveau de toutes les régions du pays. Jusqu'en 2010, ce diagnostic n'était effectué que par le laboratoire de Bactériologie Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec, situé à Dakar. L'utilisation du papier buvard comme support de prélèvement a été d'une importance capitale. Des prélèvements sont effectués au niveau de sites situés à 600 km de Dakar et envoyés au laboratoire de référence à température ambiante, en vue d'être testés. Ce n'est qu'au début de l'année 2011 que ce test a commencé à être décentralisé.

Une fois le diagnostic établi, la prise en charge de l'infection par le VIH s'envisage sur le long terme et reste globale. Si les traitements sont efficaces et capables chez la grande majorité des patients de contrôler le cours de la maladie, la prévention et la prise en charge des complications liées à la maladie, aux traitements ou au vieillissement restent des enjeux essentiels.

S'il existe quelques particularités pédiatriques d'utilisation des antirétroviraux (ARV), les objectifs généraux sont les mêmes que chez l'adulte, notamment en termes d'objectif essentiel d'obtenir une charge virale plasmatique qui doit être indétectable durablement. Le maintien de la charge virale circulante sous le seuil de détection est le seul garant d'une efficacité virologique, immunologique et clinique à long terme. Des progrès ont été effectués ces dernières années dans la mise à disposition de formes pédiatriques des antirétroviraux, même s'ils restent à être poursuivis.

La thérapie antirétrovirale a débuté au Sénégal en 1998 dans le cadre de l'initiative sénégalaise d'accès aux antirétroviraux (ISAARV), conduite par l'Etat. Sous l'impulsion de la politique du 3 X 5 de l'OMS et d'autres initiatives non gouvernementales, ce programme a été étendu progressivement à l'ensemble du territoire dès 2001 afin de pouvoir traiter 7000 malades en 2006. En 2011, 18 352 patients vivant avec le VIH (PvVIH)

étaient sous ARV et cela correspondait à une couverture de 78% (CNLS, 2012). Cependant, il y avait une hétérogénéité de cette couverture. Selon la Division de lutte contre le SIDA, elle était moins élevée chez les enfants, et n'était que de 36% en 2012. Le nombre de molécules antirétrovirales disponibles reste limité au Sénégal et le traitement ARV chez les enfants rencontre beaucoup de difficultés.

En plus de leur utilisation pour traiter l'infection à VIH, les molécules ARV sont aussi utilisées dans le cadre de la prévention de la transmission mère enfant (PTME). Cette PTME a été initiée au Sénégal depuis l'année 2000, et à ce jour plusieurs sites de prévention de la transmission verticale du VIH ont été mis en place à travers tout le territoire national. Le passage à l'échelle des interventions de la PTME s'est fait de façon progressive avec une augmentation du nombre de sites passant de 404 en 2009 à 648 en 2010 et 976 en 2011 (CNLS, 2012). Il était alors important d'étudier l'impact virologique de cette PTME chez des enfants naïfs de trithérapie ARV.

Dans notre pays, des études d'évaluation virologique ont été effectuées chez les adultes sous TARV, mais pas encore en pédiatrie.

**Cette absence de données avait motivé notre travail de recherche dont le but était d'évaluer au plan virologique certains aspects de la prise en charge pédiatrique du SIDA au Sénégal, et ainsi contribuer à une amélioration du suivi des enfants.**

**Ainsi, nos principaux objectifs spécifiques ont été:**

- De valider les performances d'une technique ARN pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH-1;**
- D'évaluer la prévalence de la résistance aux ARV chez les enfants sous première ligne de traitement et chez les nouveaux nés naïfs de trithérapie.**

En première approche, nous présenterons une revue de la littérature pour faire le point des connaissances actuelles sur l'infection à VIH, notamment chez l'enfant. Nous aborderons ensuite l'exposé analytique des travaux de recherche et leurs principaux résultats. Pour finir, nous effectuerons une synthèse des travaux présentés, dans une perspective de santé publique au Sénégal.

**Première Partie:**  
Rappels Bibliographiques

# **Chapitre 1- Le VIH: Définition-Classification-Origine**

## **1- Définition**

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine, est un virus possédant un génome sous forme d'ARN, contenu dans une capsidie protéique, elle-même entourée par une enveloppe formée d'une membrane lipidique. Ce virus appartient à la famille des Retroviridae, lesquels ont été identifiés dans de nombreuses espèces de mammifères. Ce sont des virus enveloppés, à ARN qui possèdent une reverse-transcriptase. Cette enzyme spécifique permet de transformer l'ARN viral en ADN double brin (provirus), lequel peut s'intégrer dans le chromosome cellulaire et ainsi être exprimé durant toute la vie active de la cellule. Chez l'homme, le VIH est responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA) (Gallo R C et Montagnier L, 2003).

## **2- Classification**

Le VIH appartient à la famille des Retroviridae (ou rétrovirus) et précisément à la sous famille des Orthoretrovirinae (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>). Les Retroviridae sont représentés par une large famille de virus dont le matériel génétique est composé d'ARN monocaténaire. Ils sont définis par leur mode de répliation qui passe par une étape de rétrotranscription de leur matériel génétique constitué de deux molécules d'ARN identiques, en ADN. Cette étape obligatoire à la multiplication du virus est possible grâce à une enzyme virale : la Transcriptase Inverse (TI) ou Reverse Transcriptase (RT). L'ADN néoformé intégré dans le génome de la cellule hôte se comporte comme partie intégrante de ce dernier et se réplie en même temps que lui (Coffin J M *et al.*, 1997).

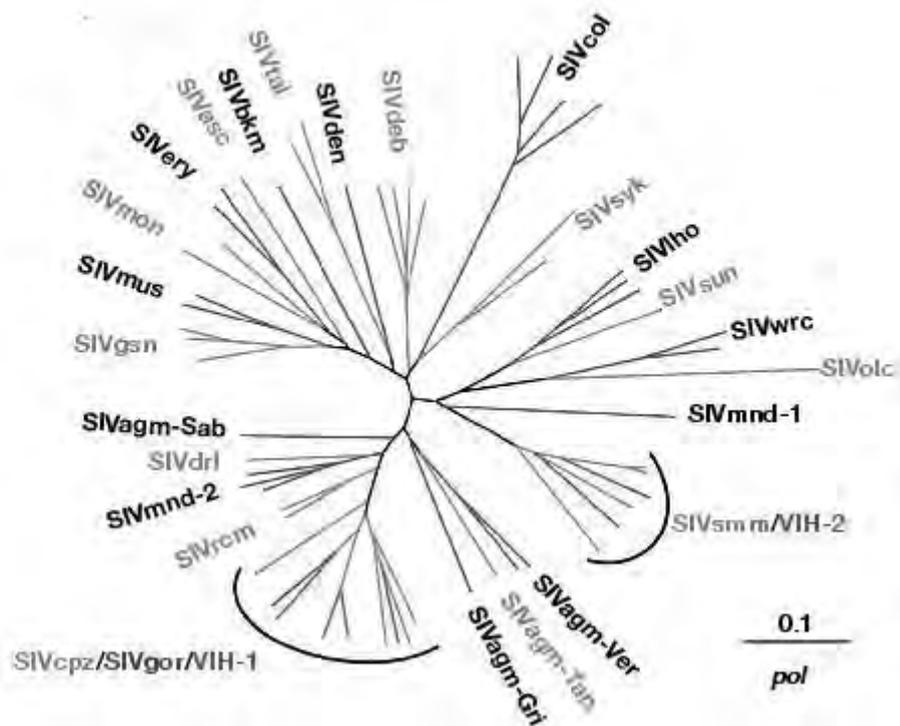
La famille des Retroviridae est divisée en deux sous familles réparties en 7 genres:

- sous famille des Spumaretrovirinae composé du seul genre Spumavirus
- sous famille des Orthoretrovirinae subdivisée en 6 genres : Alpharetrovirus, Bétaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus et les Lentivirus

Les lentivirus sont des virus qui provoquent des maladies à évolution lente (pneumonies, désordres neurologiques) et qui sont cytopathogènes en culture. Le VIH fait partie de ce genre.

### 3- Origine du VIH

Le VIH provient de multiples transmissions zoonotiques de SIV des primates non humains aux humains en Afrique de l'ouest et du centre. La transmission entre espèces est probablement survenue durant les processus de chasse, et de boucherie des primates pour la viande de brousse et la captivité, de commerce et d'élevage des singes comme animaux domestiques (Hahn *et al.*, 2000). Plus de 40 différentes espèces de primates non humains ont l'infection à SIV, et chaque espèce a un type de virus spécifique (Aghokeng *et al.*, 2010). Des transmissions zoonotiques indépendantes, des primates non humains aux humains ont engendré plusieurs lignées de VIH : VIH de type 1 (VIH-1) groupes M, N, O et P et VIH de type 2 (VIH-2) groupes A-H (Figure 1).



**Figure 1: Diversité génétique et évolution des différentes lignées SIV et VIH (Etienne L et Peeters M, 2010)**

L'étendue de l'épidémie causée par chaque groupe varie considérablement. Le VIH-1 groupe M est responsable de la pandémie globale (environ 33 millions d'individus infectés), le groupe O cause quelques milliers d'infections en Afrique de l'ouest et du centre, le groupe N a été retrouvé chez un petit nombre de personnes au Cameroun et le groupe P a récemment

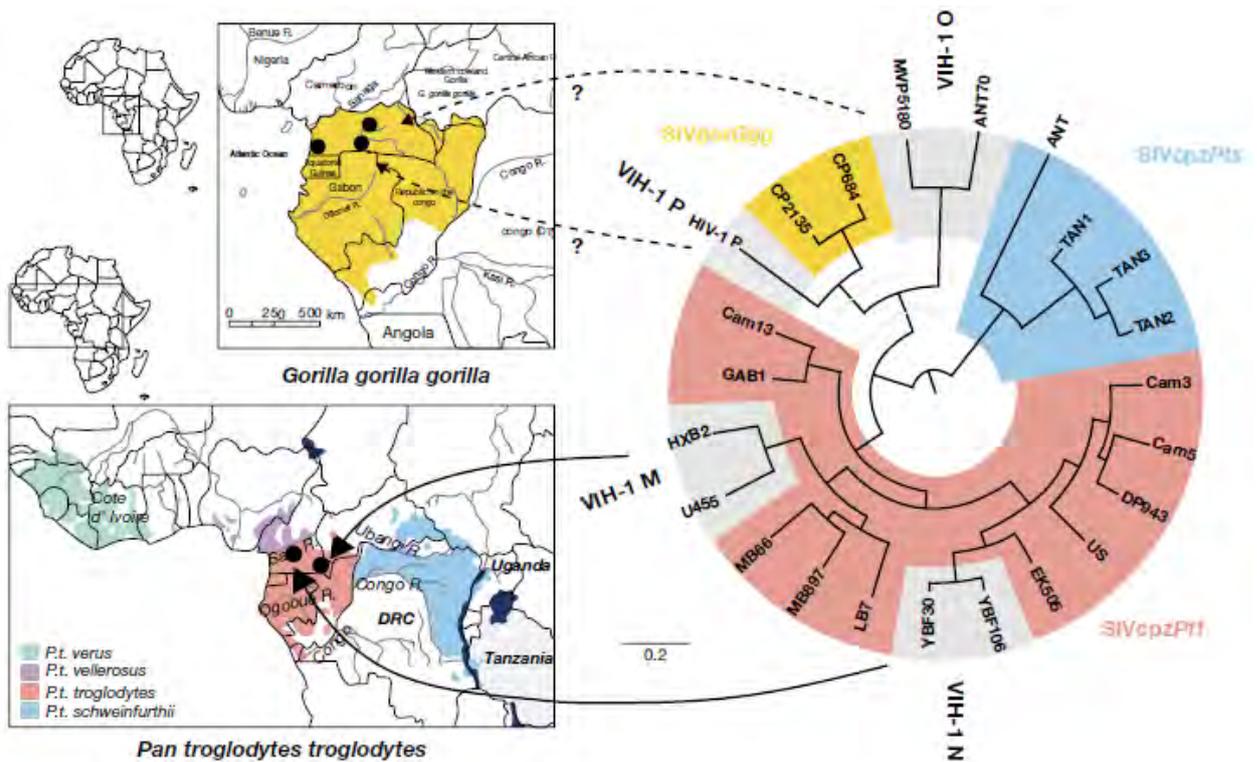
été identifié chez deux individus originaires du Cameroun (Simon F *et al.*, 1998 ; Roques P *et al.*, 2004 ; Plantier J C *et al.*, 2009 ; Ayouba A *et al.*, 2001 ; Vallari A *et al.*, 2011).

Le VIH de type 1 et celui de type 2 sont d'origines simiennes différentes.

### **3-1 Origine du VIH-1**

Les VIH-1 groupes M et N proviennent directement, mais indépendamment, du SIVcpz retrouvé chez le chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* présent au niveau de la partie ouest de l'Afrique centrale (figure 2). (Gao F *et al.*, 1999 ; Keele B F *et al.*, 2006). Les communautés de chimpanzé *P. t. troglodytes* au sud-est et au sud du centre du Cameroun forment les réservoirs naturels de SIV qui donnent naissance aux VIH-1 groupes M et N, respectivement.

Le VIH-1 groupe O et le groupe P récemment décrit sont reliés au SIVgor identifié chez le gorille (*Gorilla gorilla gorilla*) au Cameroun (Figure 2) (Etienne L et Peeters M, 2010 ; Plantier J C *et al.*, 2009 ; Keele B F *et al.*, 2006 ; Van Heuverswyn F *et al.*, 2006). C'est possible que les VIH-1 groupes O et P soient issus de transmissions indépendantes de l'espèce SIVgor, des gorilles aux humains. Le groupe P n'est jusque-là identifié que chez 2 individus originaires de Yaoundé au Cameroun (Plantier J C *et al.*, 2009 ; Vallari A *et al.*, 2011).



**Figure 2: Arbre illustrant la proximité phylogénétique des séquences de VIH-1 groupe M et N avec les séquences de SIVcpzPtt ainsi que la proximité des séquences de SIVgor avec les séquences de VIH-1 groupe O et P.**

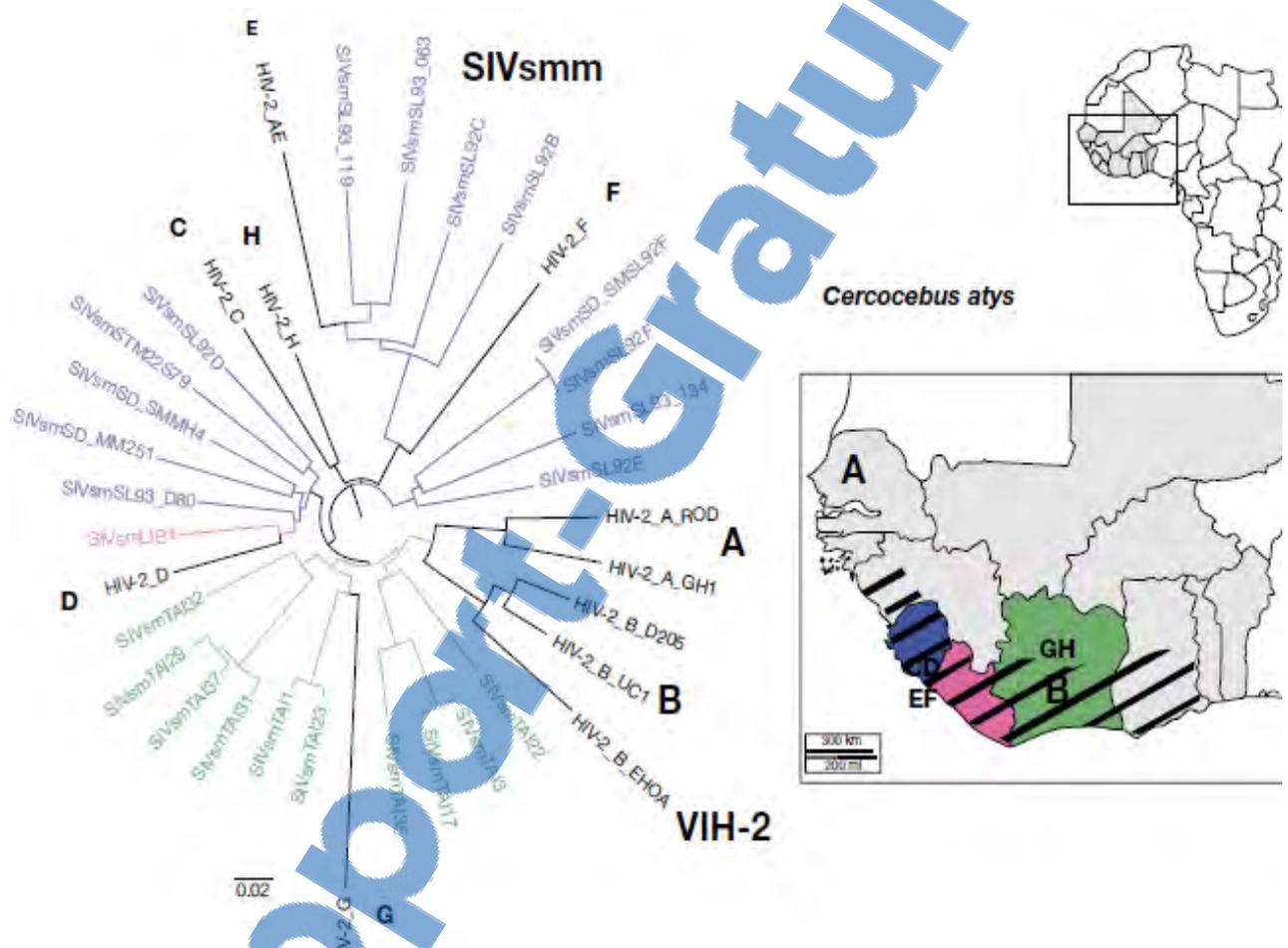
Les cartes représentent les répartitions géographiques des espèces de singe : les Gorilles en haut et les 4 sous espèces de Chimpanzés en bas. Les flèches indiquent les différents réservoirs des SIV ayant donné les différents groupes de VIH. Les flèches en pointillés montrent que les réservoirs directs des VIH-1 groupe O et P sont jusqu'à présent inconnus (Etienne L et Peters M, 2010).

### 3-2 Origine du VIH-2

Depuis sa découverte, le VIH-2 est resté largement confiné en Afrique de l'ouest, avec des taux de prévalence les plus élevés au Sénégal et en Guinée Bissau (de Silva T I *et al.*, 2008). Le VIH-2 a une première fois était décrit comme provenant du sooty mangabey (Hirsch V M *et al.*, 1989) et cela a par la suite était confirmé en démontrant que les hommes qui vivaient en Afrique de l'ouest portaient des souches de VIH-2 qui ressemblaient aux souches de SIVsmm (SIV du sooty mangabey) locales (Gao F *et al.*, 1992 ; Chen Z *et al.*, 1996). Le fait que le sooty mangabey soit fréquemment chassé comme animal de compagnie dans plusieurs régions de l'Afrique de l'ouest confirme des voies possibles de transmission.

L'arbre de la figure 1 illustre la proximité phylogénétique entre le SIVsmm du Sooty mangabey et les souches de VIH-2 (Etienne L et Peeters M, 2010).

Depuis son premier isolement, au moins 8 lignées distinctes du VIH-2 ont été identifiées, et chaque lignée semble représenter un transfert indépendant (figure 3). Par analogie avec le VIH-1, ces lignées ont été nommées groupes A-H, et seuls les groupes A et B se sont répandus chez l'humain à un degré substantiel. D'après les résultats de travaux menés en Côte d'Ivoire, il serait probable qu'il y ait un neuvième groupe du VIH-2 (Ayoub A *et al.*, 2012).



**Figure 3: Arbre phylogénétique des VIH-2 et SIVsmm**

A droite: arbre montrant la proximité entre les souches de SIVsmm et les groupes du VIH-2

A gauche: carte géographique représentant l'habitat des singes mangabey et la localisation des groupes de VIH-2 (Etienne L et Peeters M, 2010).

## Chapitre 2: Biologie du virus

### 1- Morphologie et structure

Les rétrovirus se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de 80 à 120 nm (Figure 4). Ces particules sont constituées d'une enveloppe externe d'origine cellulaire dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe du virus. Cette enveloppe, tapissée à l'intérieur de la particule virale par une matrice, entoure la capsid virale centrale ou excentrée, qui contient le génome viral, la nucléocapside et les enzymes nécessaires à la réplication du virus.

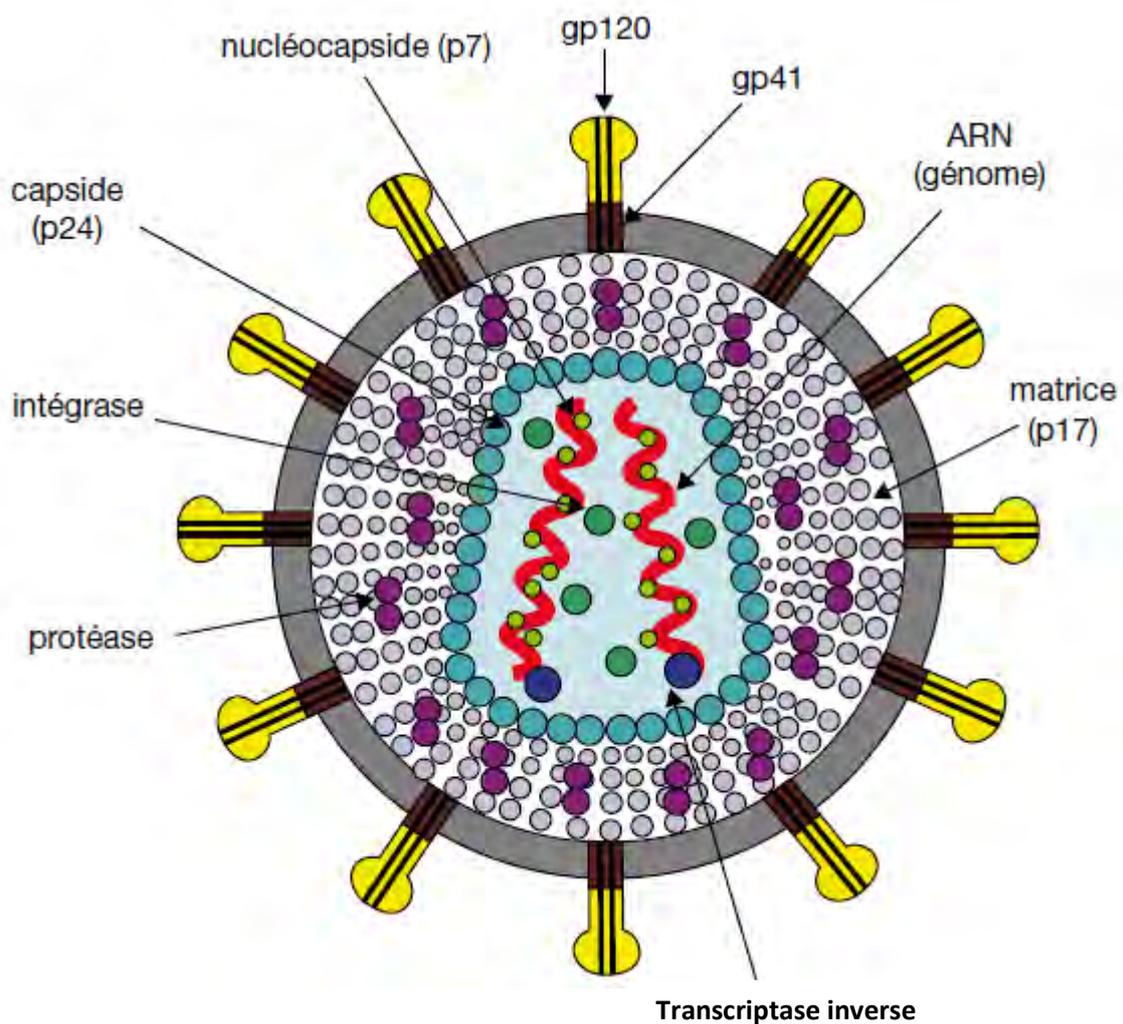


Figure 4: Coupe schématique du virus de l'immunodéficience humaine (Larrouy L *et al.*, 2010)

## 2- Organisation génomique du VIH

Le génome du VIH est présent en deux copies d'ARN identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux, *gag*, *pol*, *env*, (figure 5) (Gonda M A, 1988) qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. Le gène *gag* mène à la production du précurseur Gag (Pr55) qui, suite à son clivage, produit la matrice (MA) (p17), la capside (CA) (p24), la nucléocapside (NC) (p7) et une petite protéine p6. Ces protéines structurales sont essentielles pour obtenir une particule virale complète. De son côté, le gène *pol* code pour les enzymes telles que la TI (rétrotranscription de l'ARN en ADN), l'intégrase (IN) (intégration de l'ADN viral au génome cellulaire) et la protéase (PR) (maturation des particules virales). Finalement, le gène *env* permet la production des protéines qui constituent l'enveloppe soient la glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41.

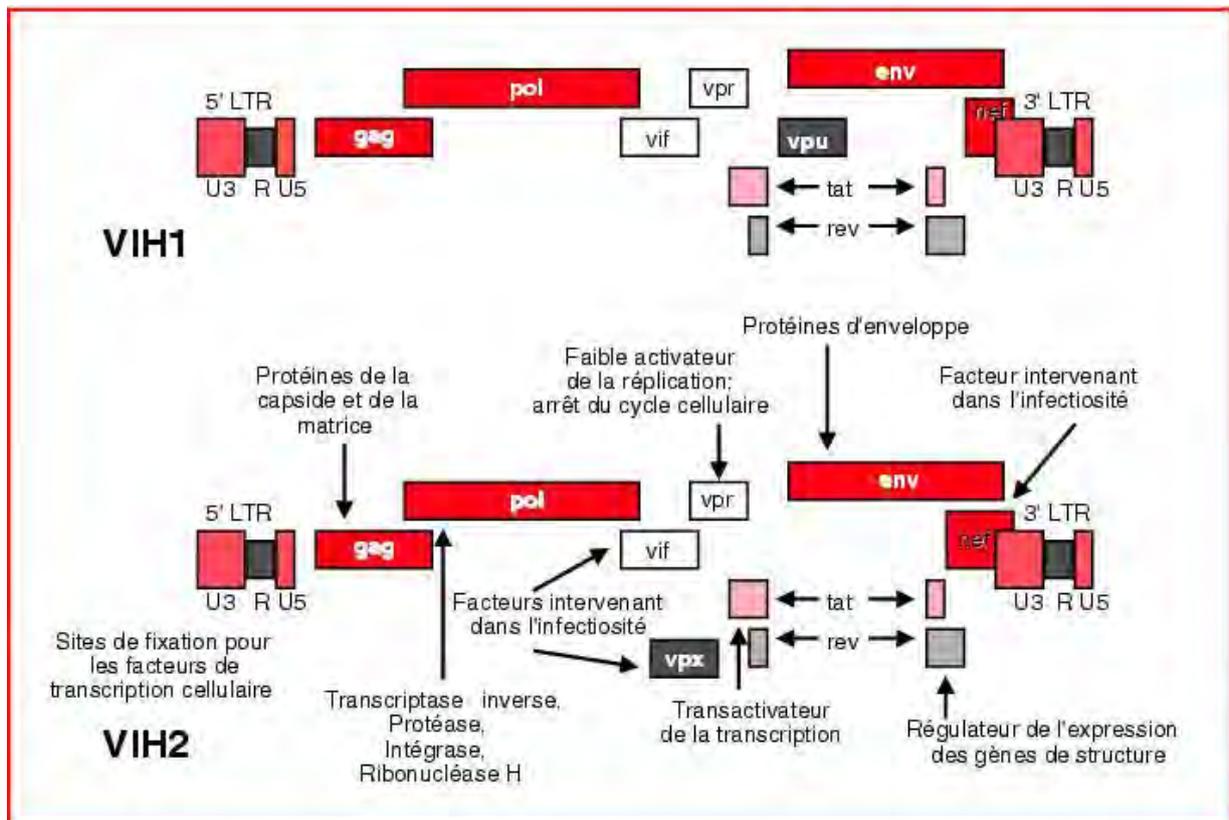


Figure 5: Organisation génomique du VIH-1 et du VIH-2 (Damond F *et al.*, 2003)

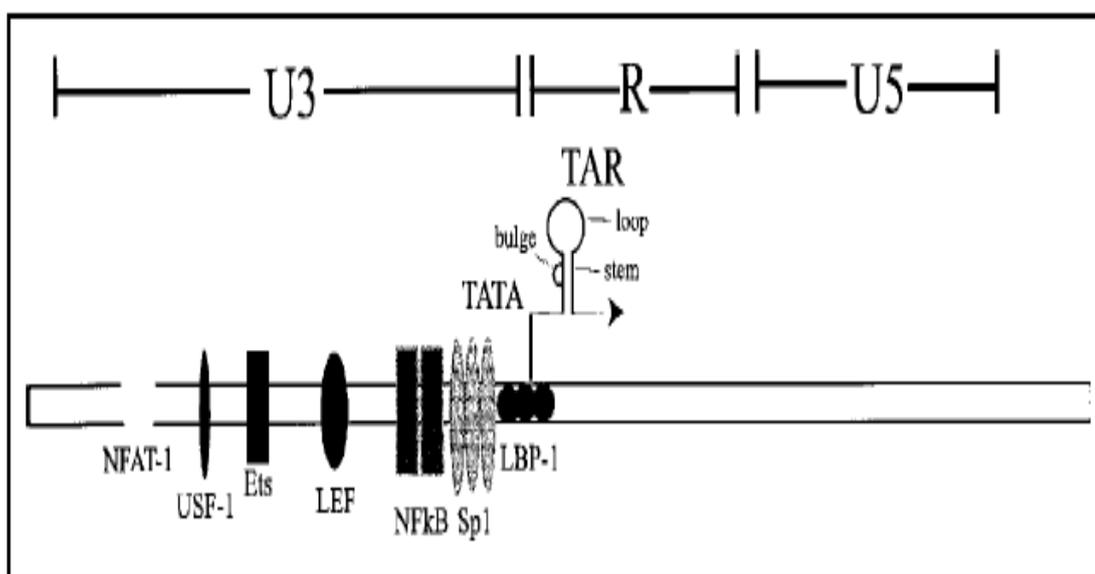
Le génome à ARN simple brin est rétrotranscrit en ADN double brin lors de l'entrée du virus dans la cellule. Une même séquence de taille variable (Long Terminal Repeat ou

LTR) est présente à chaque extrémité de l'ADN viral; cette séquence, qui permet l'intégration de l'ADN sous forme d'un provirus dans le génome de la cellule hôte, contient les éléments promoteurs nécessaires à l'expression des gènes.

L'organisation du génome du VIH est complexe car, outre trois gènes rétroviraux classiques, il existe deux régions particulières, situées entre les gènes *pol* et *env*, et à la suite du gène *env* (figure 5), lesquelles contiennent au moins six gènes viraux supplémentaires, dénommés *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* ou *vpx* (pour le VIH-2) et *nef*. Les protéines codées par ces gènes supplémentaires sont, pour la plupart, impliquées dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales et, par là même, de la multiplication du virus. (Seelamgari A *et al.*, 2004). Elles sont également capables de modifier l'expression de certains gènes cellulaires, et donc de provoquer une altération du fonctionnement des cellules de l'immunité touchées par le virus.

## 2-1 Les LTR

Les LTR sont composés de trois régions, U5, R et U3 (figure 6) intervenant dans la transcription du génome viral et dans son intégration au sein du génome cellulaire. Le LTR est pour la plupart des rétrovirus, l'équivalent des régions promotrices des gènes cellulaires.

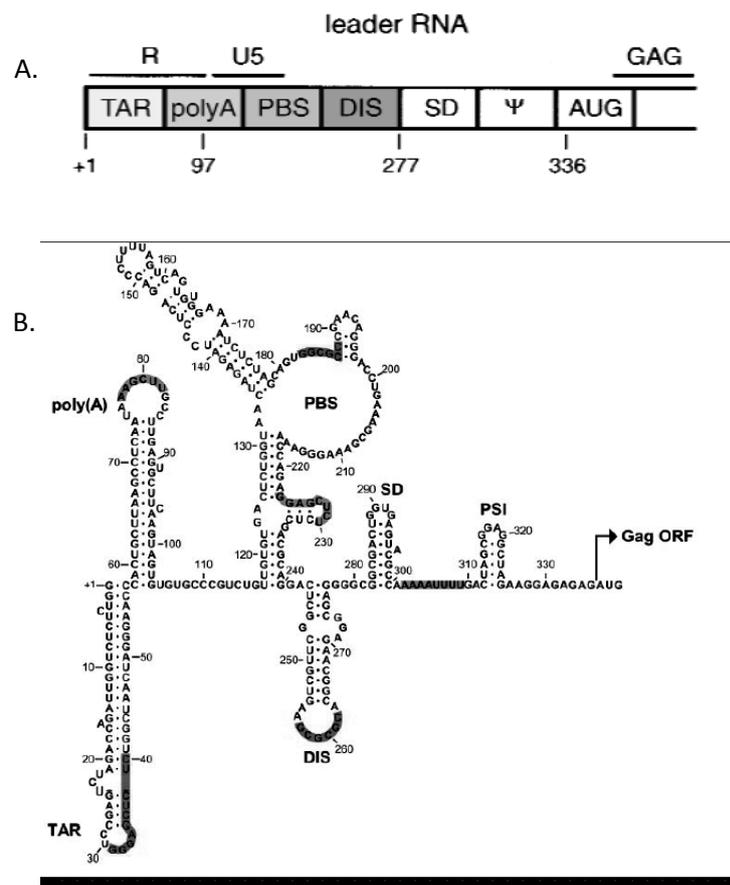


**Figure 6: Schéma du LTR 5' du provirus.**

Schéma indiquant la position des sites de liaison de certains facteurs cellulaires (Freed E O, 2001)

La région U3 comprend des sites de liaisons pour des facteurs de transcription cellulaires dont le NFkB (généralement en 2 sites successifs) et le SP1 (3 sites de fixation).

Le NFkB, séquence stimulatrice encore appelée enhancer, est présent dans tous les isolats du VIH-1 mais également dans ceux du VIH-2; il est intéressant de noter que les souches virales du sous-type C du VIH-1 renferment 3 voire 4 copies de ce facteur (Montano M A *et al.*, 1997). Les sites de fixation du facteur SP1 ont la propriété de réguler non seulement d'autres facteurs de transcription cellulaire, d'interagir avec la protéine Tat mais aussi avec le NFkB pour induire la transcription (Perkins N D *et al.*, 1993).



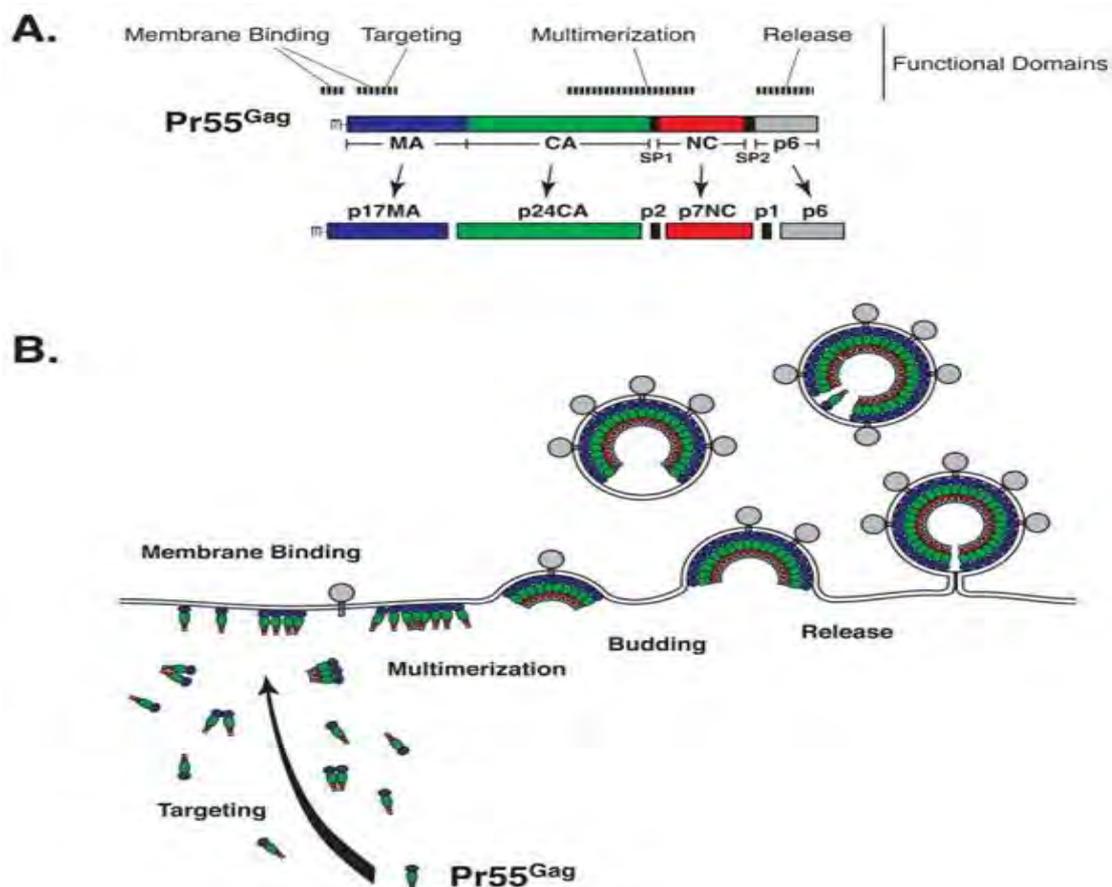
**Figure 7 (A et B) : Schéma du leader RNA du provirus**  
 7A (Huthoff H et Berkhout B, 2001) 7B (Andersen S E *et al.*, 2004)

Les régions R et U5 sont incluses dans le «leader RNA» (figure 7) qui est constitué de différents éléments (TAR, polyA, PBS, DIS, SD, PSI) représentant une structure en épingle à cheveux. Ces éléments interviennent dans la régulation de l'expression des gènes (activation de la transcription, polyadénylation, translation...) et dans les fonctions associées au virion

(dimérisation, encapsidation et transcription inverse) (Berkhout B, *et al.*, 1996; Huthoff *et al.*, 2001).

## 2-2 Le gène *gag* (gène des antigènes de groupe)

C'est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. Il fait environ 1500pb et code pour la polyprotéine Pr55 N-myristylée qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsid (CA), la Nucléocapsid (NC) et la p6 (figure 8A). Au cours de la maturation, le clivage de la Pr55 par la protéase virale (PR) donne les protéines structurales du virion mature p17MA, p24CA, p7NC, p6 et 2 petits fragments p1gag et p2gag (Freed E O *et al.*, 1998).



**Figure 8 (A et B) : Organisation du gène *gag* et production des particules virales**

8A : Organisation génomique du gène *gag* et sites fonctionnels ; 8B : Interaction entre la protéine Pr55<sup>Gag</sup> et la membrane phospholipidique (Ono A, 2009)

La protéine p17MA constitue la matrice virale. Elle participe à la stabilité de la structure virale, grâce à sa liaison avec des lipides de la bicouche phospholipidique constituant

l'enveloppe virale. En effet, elle représente l'extrémité N-myristilée qui permet à la Pr55 de cibler les sites d'assemblage au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées (Bouamr F *et al.*, 2003; Bathia A *et al.*, 2007).

La p17MA est essentielle à la pénétration du virus dans les cellules par la régulation de l'étape de fusion entre les membranes virale et cellulaire (Murakami T *et al.*, 2004).

La p24CA représente la protéine majeure du core du virus. Il s'agit d'une protéine de 24kD, phosphorylée qui se présente sous forme oligomérique. Elle se condense autour du génome viral pour donner la nucléocapside de forme conique. Elle comprend 2 domaines indépendants connectés par un lien peptidique flexible. La partie C-terminale, contenant la région homologue majeure (MHR pour major homology region) très conservée, apparaît essentielle pour l'assemblage de la particule virale (Gamble T R *et al.*, 1997; Gitti R K *et al.*, 1996). La région N-terminale du gène, en particulier les résidus proline, serait indispensable à la morphogénèse d'une capsid conique mature et au caractère infectieux des particules virales néoformées (Fitzon T *et al.*, 2000; Tang S *et al.*, 2003; Rulli S J *et al.*, 2006).

La p7 NC est une petite protéine (de moins de 100 acides aminés) fortement basique liant l'ARN génomique dont elle assure l'encapsidation dans le virion en assemblage (Berkowitz R *et al.*, 1996; D'Souza V *et al.*, 2005). Mais elle est surtout indispensable à la dimérisation de l'ARN viral (Feng Y X *et al.*, 1999; Song R *et al.*, 2007b) et permet l'initiation de la réaction de transcription inverse.

La p6 est importante pour l'incorporation de la protéine accessoire Vpr à laquelle elle reste associée (Kondo E *et al.*, 1995) et la libération des virions (Huang M *et al.*, 1995) (figure 8B). Elle jouerait également un rôle important dans le recrutement et l'encapsidation des protéines Pol dans le virion en assemblage (Yu X F *et al.*, 1998).

Les peptides p1 et p2 ne sont pas uniquement des produits de clivage qui permettent la régulation de l'activité de la protéase ; la p2 comprise entre les protéines de la capsid et la protéine de la nucléocapsid, est essentielle à l'assemblage et à la production de particules virales infectieuses (Krausslich H G *et al.*, 1995; Guo X *et al.*, 2005).

### **2-3 Le gène *pol***

C'est le gène le plus conservé du génome. Il code pour les 3 enzymes virales, PR, TI et IN, qui sont obtenues après clivage du précurseur Pr160Gag-Pol. La Pr160Gag-Pol est une polyprotéine engendrée parallèlement au précurseur Pr55gag mais en moindre quantité, par un saut de cadre de lecture au niveau d'une structure particulière de l'ADN proviral riche en T. Il est incorporé sous forme non clivée dans la particule virale. Son clivage intervient lors de la

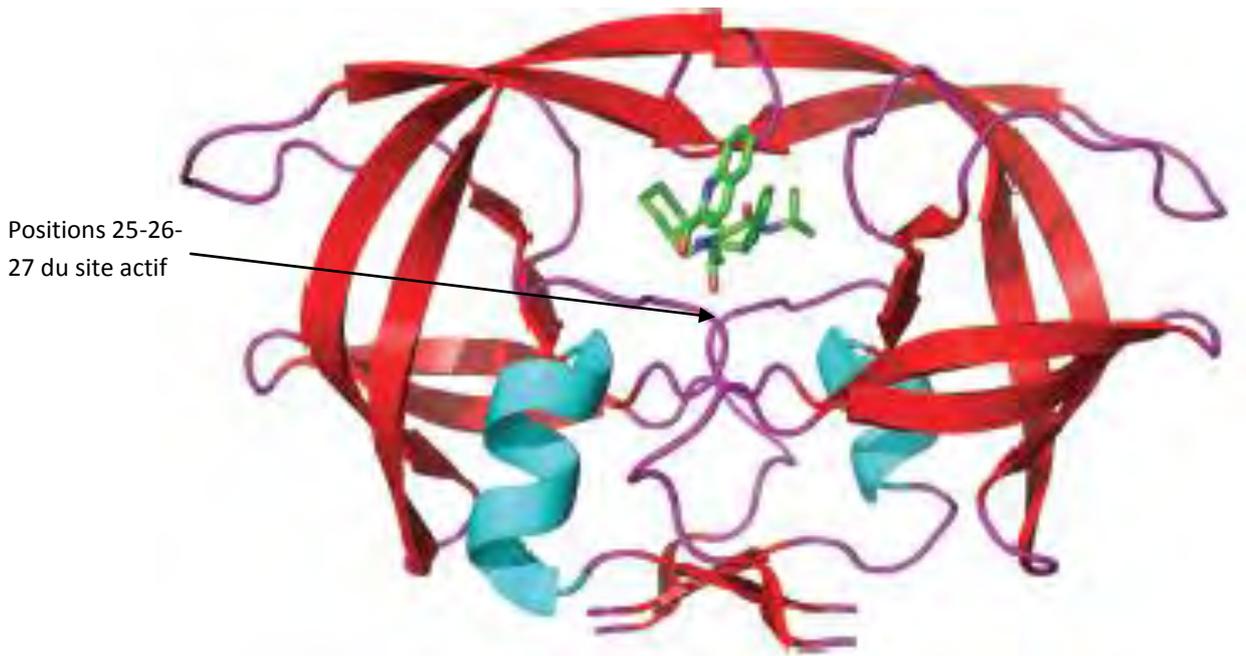
maturation après l'étape de bourgeonnement. Ce clivage se fait par la partie enzymatique de ce précurseur (protéase) ainsi que le précurseur Pr55gag. La proportion relative de chacun de ces précurseurs est importante pour l'infectivité du virus (Shehu-Xhilaga M *et al.*, 2001).

### **2-3-1 La protéase virale (PR)**

Elle est essentielle à la maturité de la particule virale infectieuse. C'est l'enzyme indispensable au processus post-traductionnel, c'est-à-dire le clivage des polyprotéines Pr55gag et P160gag-pol (Pettit S C *et al.*, 1993). Il s'agit d'une aspartyl-protéase qui, du point de vue structural, se présente sous forme d'un homodimère de 99 acides aminés. Les deux monomères sont liés de façon non covalente et symétrique par 4 chaînes  $\beta$ -antiparallèles (figure 9).

L'activité enzymatique est assurée par 2 molécules d'acide aspartique situées au cœur du site catalytique de l'enzyme constitué par la triade Asp-Thr-Gly aux positions 25 à 27. Cette triade conservée se trouve à la jonction des deux monomères ; elle forme ainsi un tunnel, permettant une interaction avec 7 à 9 acides aminés, dont l'activité va générer 9 séquences peptidiques différentes. Cela aboutit à la synthèse des protéines P17, P24, P6 et P7, à partir du gène *gag*, et des enzymes Pr, TI et IN à partir de la polyprotéine Gag-Pol. Ce clivage semble s'effectuer à des sites bien précis de ces protéines, grâce à l'affinité qui diffère d'un site à l'autre (Pettit S C *et al.*, 1993).

La protéase est une des cibles de la thérapeutique antirétrovirale. Les molécules ou inhibiteurs de cette enzyme ont donc une forte affinité pour le site actif de la protéase, dont elles inhibent l'activité enzymatique de manière irréversible (Boden D *et al.*, 1998).



**Figure 9: Structure schématique de la protéase du VIH.**

En vert : un inhibiteur de protéase (le saquinavir) lié au site actif de l'enzyme (Adamson C S, 2012)

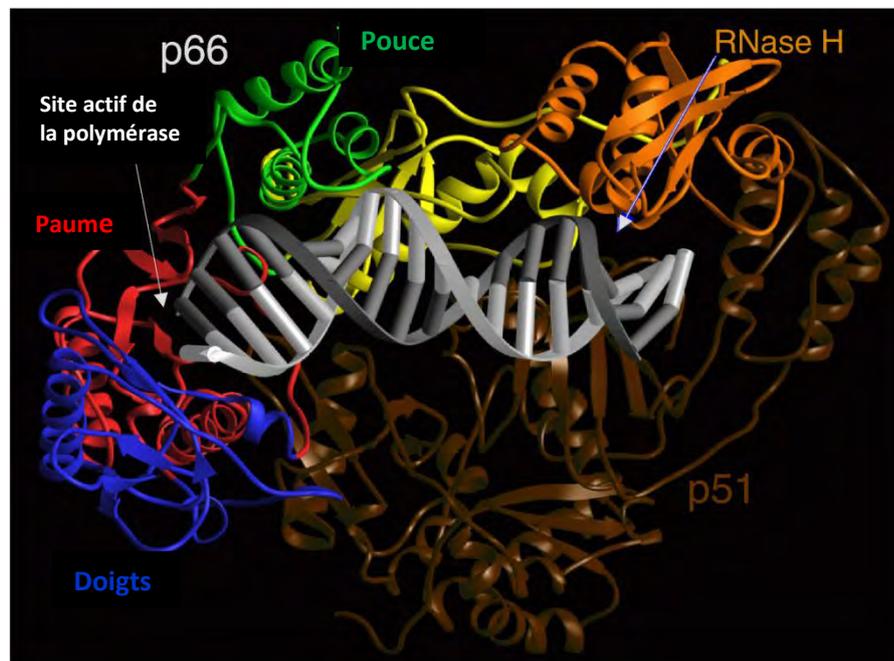
### 2-3-2 La transcriptase inverse

C'est une ADN polymérase ARN dépendante, dotée d'une activité RnaseH. Elle assure la conversion de l'ARN viral en ADN proviral. C'est une cible majeure de la thérapeutique antirétrovirale. Elle est, avec le fort taux de réplication du virus, responsable de la grande diversité du VIH du fait de la survenue de nombreuses erreurs pendant les cycles de réplication, dues à l'absence de fonction de correction.

Du point de vue structural, la transcriptase inverse se présente sous forme d'un hétérodimère constitué de 2 sous unités, la P66 et la P51 (figure 10) (di MarzoVeronese F *et al.*, 1986). La grande sous unité, P66, constituée de 560 acides aminés, comprend les 2 domaines fonctionnels de la RT que sont la polymérase et le domaine RNase H. La petite sous-unité, P51, contient les 440 premiers acides aminés de la P66 correspondant, mais pas totalement, au domaine de la polymérase.

Le domaine polymérase de la P66 (ressemblant à une main droite) est lui-même divisé en 4 sous-domaines dénommés « doigts », « pouce », « paume » et sous-domaine de connexion liant les domaines polymérase et Rnase H (cf figure 10). Bien que la sous-unité P51 contienne les mêmes 4 sous-domaines retrouvés dans le domaine polymérase de la P66, les relations physiques entre les sous-domaines sont différents ; la P51 ne possède pas

d'activité enzymatique et ne joue pas de rôle direct dans le processus de polymérisation (Kohlstaedt L A *et al.*, 1992).



**Figure 10 : Schéma de la transcriptase inverse dans un complexe avec un acide nucléique**

Les sous-domaines de la sous-unité p66 sont colorés en bleu, rouge, vert, jaune et orange. La sous-unité p51 est en marron et l'acide nucléique est en gris. Le site actif de la polymérase est indiqué par la flèche située à gauche sur la figure (Sarafinos S G *et al.*, 2009).

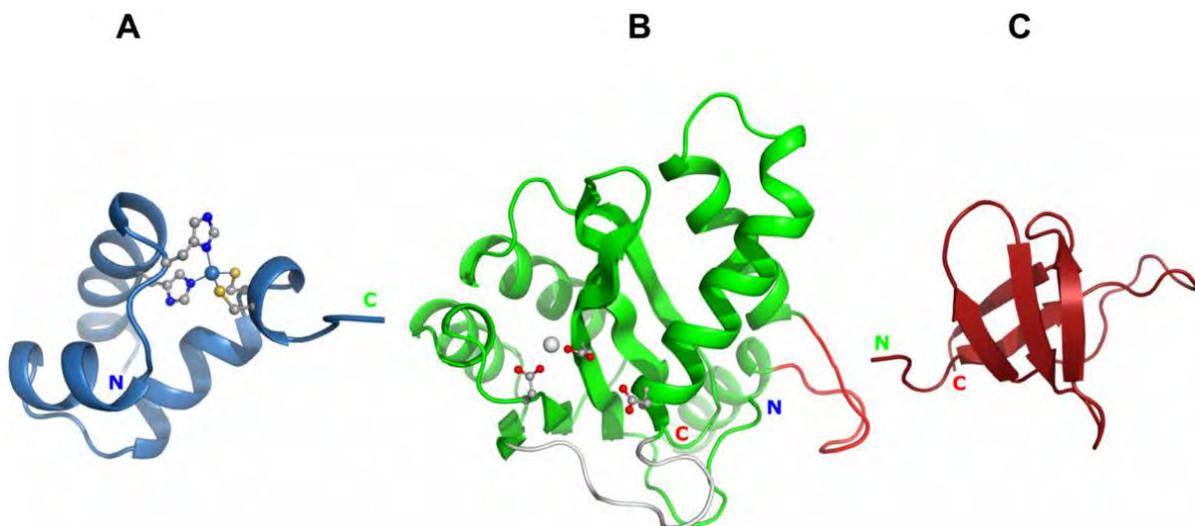
En effet, malgré la présence dans le P51 des 3 acides aminés (Asp 110, Asp 185 et Asp 186) du site catalytique du domaine polymérase (au niveau de la paume), il n'y a pas d'activité de polymérase fonctionnelle au niveau de la petite sous-unité. La fonction primaire de la P51 serait donc de maintenir la structure active de la P66 (Hostomsky Z *et al.*, 1992 ; Hughes S H, 2001; Mulky A *et al.*, 2005).

La Rnase H représente la partie C-terminale de la P66 ; d'une longueur de 120 acides aminés, cette endonucléase a pour rôle d'hydrolyser le brin d'ARN à partir de l'hybride ARN/ADN formé après synthèse du brin d'ADN complémentaire par la transcriptase inverse. Son activité est modulée par la sous-unité P51, probablement via des interactions avec le domaine catalytique de la Rnase H au niveau de la P66 (Sevilya Z *et al.*, 2003 ; Bochner R *et al.*, 2008).

### 2-3-3 L'intégrase

C'est l'enzyme qui catalyse l'insertion dans le génome de la cellule infectée, de l'ADN double brin néo-synthétisé par la transcriptase inverse. Il s'agit d'une protéine de 288 acides aminés, obtenu par clivage protéase-dépendante de la polyprotéine Gag-Pol qui comprend 3 domaines indépendants (figure 11):

- un domaine N-terminal avec un motif en doigt de zinc (Zheng R *et al.*, 1996),
- un domaine central ou domaine catalytique impliqué dans la liaison avec les extrémités de l'ADN viral (Johnson A A *et al.*, 2006; Nowotny M, 2009),
- un domaine C-terminal qui lie l'ADN viral de façon non spécifique et qui participe essentiellement à la stabilité du complexe ADN-IN (Chen J C *et al.*, 2000).



**Figure 11 : Représentation schématique de l'intégrase du VIH**

Le domaine N-terminal en bleu (A), le domaine central ou domaine catalytique en vert (B) et le domaine carboxy-terminal en rouge (C) (Jaskolski *et al.*, 2009).

L'intégrase fonctionne sous forme oligomérique, et il semble que chacun des domaines de la protéine participe à cette oligomérisation (Hare S *et al.*, 2009). Elle possède 2 activités catalytiques majeures : un clivage endonucléolytique au niveau des extrémités 3'-OH du génome viral qui prépare l'ADN au processus d'intégration et un transfert de brin permettant l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire cible. Au cours de la première étape, dite de maturation, les extrémités des LTR de l'ADN viral sont reconnues et coupées spécifiquement

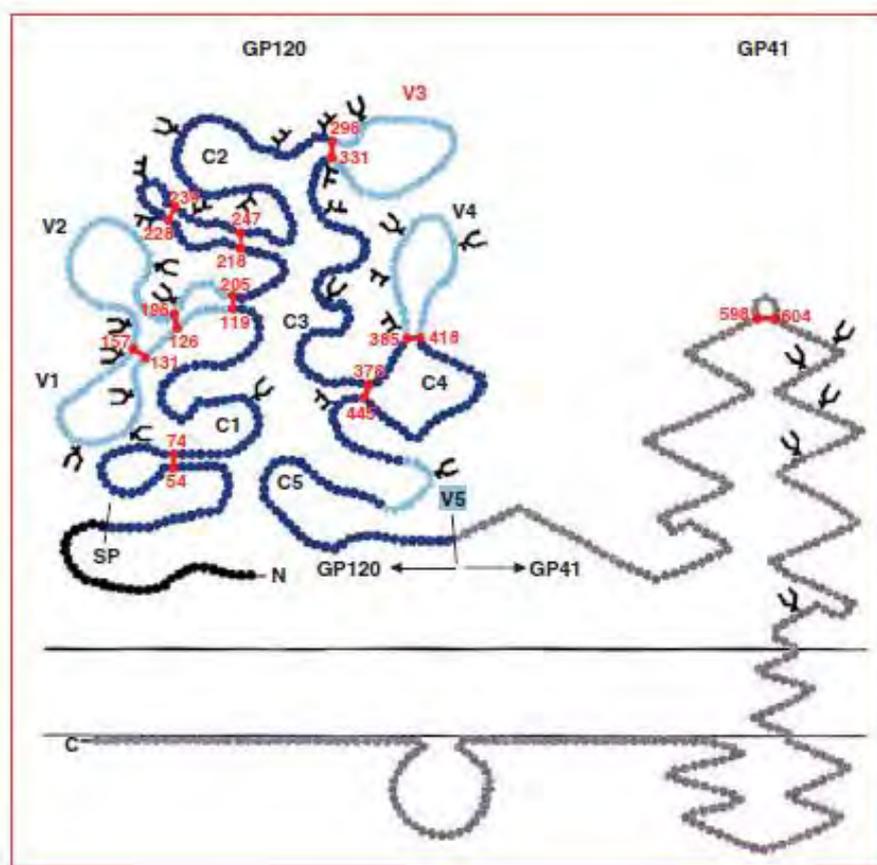
par IN, sous forme oligomérique, avec libération d'un dinucléotide 5'GT3'. Au cours de la deuxième étape, dite de transfert de brins, chaque groupement 3'-OH généré suite à l'excision attaque un brin de l'ADN cellulaire pour intégrer l'ADN viral dans le génome cellulaire via un mécanisme de transestérification (Jaskolski M *et al.*, 2009).

Cette étape clé du cycle de multiplication du virus est devenue aussi une cible de molécules ARVs, les anti-intégrases qui agissent en amont de l'intégration du provirus notamment en bloquant le transport du complexe de pré-intégration (Nair V *et al.*, 2007).

## **2-4 Le gène *env***

Il code pour les glycoprotéines d'enveloppe, gp120 et gp41 (gp125 et gp36 pour le VIH-2) qui sont responsables de la fixation du virus sur le récepteur cellulaire et de l'entrée du virus dans la cellule; du fait de leur position à la surface du virus, elles sont les cibles idéales pour les anticorps neutralisants. C'est le gène le plus variable; il est caractérisé par un polymorphisme important qui permet l'échappement du virus par rapport au système immunitaire.

Les glycoprotéines sont initialement synthétisées sous forme d'un précurseur polyprotéique, la gp160 (figure 12) qui sera modifiée par glycosylation avant d'être clivée en 2 protéines (gp120 et gp41) par une protéase cellulaire. La gp120 et la gp41 restent associées par des liaisons non covalentes et sont transportées vers les membranes où elles sont incorporées dans les virions lors du bourgeonnement. Matures et fonctionnelles, elles se présentent sous forme de trimères d'hétérodimères gp120-gp41 à la surface du virus (Center R J *et al.*, 2002). La gp120 contient le domaine de liaison qui lui permet de se lier au récepteur CD4 et au corécepteur (récepteur de chimiokines, CCR5 ou CXCR4) sur la cellule cible (Dalglish A G *et al.*, 1984; Berger E *et al.*, 1999; Gaibel et G *et al.*, 2006); la gp41 contient le domaine de trimérisation et est responsable de la fusion des membranes virales et cellulaires (Chan D C *et al.*, 1997; Buzon V *et al.*, 2010).



**Figure 12 : Représentation schématique du précurseur gp160.**

Le peptide signal est indiqué en noir (SP). La glycoprotéine de surface gp120 est indiquée en bleu, les régions conservées en bleu foncé (C1-C5) et les boucles variables en bleu clair (V1-V5). La glycoprotéine transmembranaire gp41 est représentée en gris et contient une boucle formée par un pont disulfure. Les sites de glycosylation des chaînes mannosidiques (F) et des chaînes glycosidiques complexes (Y) sont indiqués. Les résidus cystéines sont numérotés et indiqués en rouge, ainsi que les ponts disulfures. (Pancera M, 2005)

### 2-4-1 La glycoprotéine de surface gp120

La glycoprotéine de surface gp120 est organisée en cinq régions constantes dont les séquences sont semblables parmi les différentes souches virales (C1-C5) et cinq régions variables qui diffèrent considérablement entre les souches, appelées boucles variables (V1-V5) (Starcich B R *et al.*, 1986; Pancera M, 2005).

Le site de liaison entre la gp120 et la molécule CD4 est situé entre les domaines conservés C3 et C4, bien que d'autres résidus jouent également un rôle. L'interaction gp120-gp41 est responsable d'un changement important de conformation au sein de la gp120 qui déplace les boucles V1/V2 pour faire apparaître le site de liaison du corécepteur CCR5 ou CXCR4 (Ashish *et al.*, 2006). La boucle V3 est également responsable du tropisme du virus car c'est elle qui détermine le choix du récepteur aux chimiokines, CCR5 ou CXCR4

(l'augmentation de charges positives favorise la liaison au récepteur CXCR4 par rapport à CCR5) (Basmaciogullari S *et al.*, 2002).

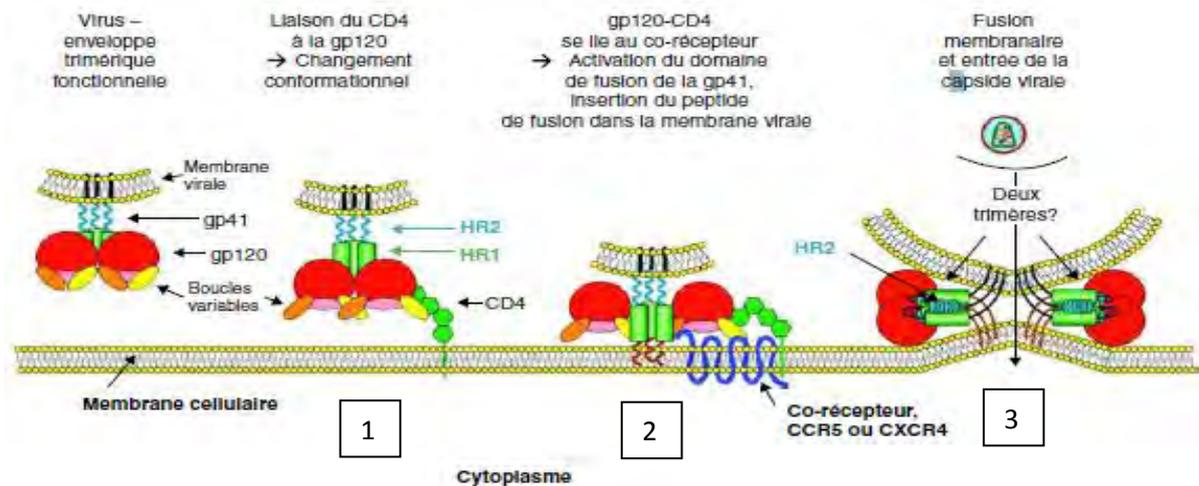
D'un point de vue antigénique, la gp120 induit la synthèse d'anticorps dirigés contre les sites conservés de liaison du récepteur et des corécepteurs, qui sont des cibles évidentes pour les anticorps neutralisants. Cependant, les boucles variables peuvent aussi induire efficacement des anticorps neutralisants. Ces anticorps sont généralement spécifiques de souches mais deviennent inefficaces lorsque le virus mute pour échapper aux pressions du système immunitaire de l'hôte (Yang Z Y *et al.*, 2004).

#### **2-4-2 La gp41 (transmembranaire)**

La glycoprotéine Gp41 contient un domaine N-terminal fusogénic, promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminale de la Gp120 par des liaisons non covalentes (Pancera M, 2005).

Du point de vue structural, la gp41 est un trimère composé de 340 acides aminés et de 3 domaines: un ectodomaine N-terminal d'environ 180 acides aminés qui contient quatre sites de N-glycosylation, un pont disulfure qui intervient dans la formation des complexes trimériques, une ancre transmembranaire et un long domaine intra cytoplasmique contenant des motifs variés contribuant à la réplication virale (Chan D C *et al.*, 1997 ; Center R J *et al.*, 2002). L'ectodomaine comprend une vingtaine d'acides aminés hydrophobes appelée peptide fusion en position N-terminale et deux régions de répétitions d'heptapeptides contigus, HR1 (responsable de la trimérisation de la protéine) et HR2. La fusion membranaire est sous la dépendance de ce peptide de fusion qui va s'insérer dans la membrane cellulaire après la liaison de la gp120 avec les récepteurs, mais également d'un changement de conformation au niveau des régions HR1 et HR2 (figure 13) qui permet de rapprocher les membranes virales et cellulaires (Eckert D M *et al.*, 2001; Sackett K *et al.*, 2006). Les inhibiteurs de fusion s'opposent à ce changement en se liant à HR1 (Liu S *et al.*, 2007).

Du point de vue antigénique, la gp41 induit la formation d'anticorps non neutralisants au niveau de la boucle immunodominante et de l'extrémité N-terminale du HR2 (Gorny M K *et al.*, 2000) mais aussi des anticorps neutralisants dirigés contre la région de l'ectodomaine proche de la membrane (Montero M *et al.*, 2008).



**Figure 13: Rôle de la gp41 dans l'entrée du VIH dans la cellule.**

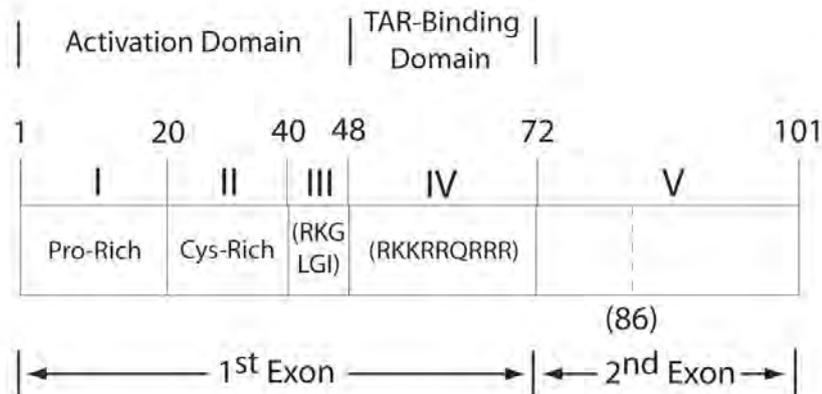
Les différentes étapes de l'entrée du VIH dans les cellules sont décrites. La gp120 en se liant au récepteur CD4 (1) et au co-récepteur subit des changements de conformation qui permettent au peptide de fusion de la gp41 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible (2) en formant un état de transition. La gp120 se dissocie du complexe et la gp41 subit d'autres transformations qui conduisent au faisceau d'hélices. La formation du faisceau de 6 hélices permet la fusion complète des deux membranes (3) qui conduit à la libération du génome viral dans le cytoplasme des cellules (Pancera M, 2005).

## 2-5 Les gènes de régulation *tat* et *rev* et les gènes auxiliaires *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*

Ils codent pour des protéines virales dont tous les rôles ne sont pas encore tout à fait élucidés. Les protéines de régulation Tat et Rev sont nécessaires pour la réplication virale. Les protéines Vif, Vpr, Vpu et Nef (encore appelées accessoires) ne sont pas indispensables à la réplication virale *in vitro* mais leur implication dans le cycle réplcatif du virus a été prouvée. Elles sont souvent nécessaires à la réplication virale et participent à l'infectiosité du virus, à sa pathogénicité et sa persistance en modifiant l'expression de gènes cellulaires.

### 2-5-1 Le gène *tat* (trans-activator of transcription)

C'est un petit gène, codant pour une protéine de 86 à 101 acides aminés, qui a comme fonction essentielle d'activer la transcription des ARNm viraux. Il est formé de deux exons qui codent pour les protéines p16Tat et p14Tat, toutes deux fonctionnelles. Il s'agit d'une protéine nucléaire hautement basique contenant un signal de localisation nucléaire et qui peut être divisée en 5 domaines fonctionnels (Liang C *et al.*, 2002) (figure 14).



**Figure 14 : Domaines fonctionnels de la protéine Tat.**

Domaine I riche en Proline, domaine II riche en Cystéine, domaine III intervenant dans la liaison avec les facteurs cellulaires comme la Cyc T1 ou SP1, domaine IV hautement basique intervenant dans la liaison avec TAR et domaine V qui correspond au 2<sup>ème</sup> exon (Liang C *et al.*, 2002).

La p14, première synthétisée, se lie à l'élément TAR au niveau d'une structure en épingle à cheveux comprenant un renflement de trois nucléotides pyrimidiques hautement conservés via une région basique riche en arginine et en lysine (Weeks K M *et al.*, 1990; Brady J *et al.*, 2005). Elle recrute le complexe cycline T1/cycline Kinase dépendante 9 (CDK9) qui représente en fait le facteur positif de la transcription. Le CDK9 enclenche le processus de transcription à partir du promoteur viral en hyperphosphorylant l'extrémité carboxy-terminale de l'ARN polymérase II, ce qui permet ainsi à l'enzyme d'être plus processive : sans la protéine Tat, la transcription s'arrête très vite, ne permettant pas la synthèse d'ARNm fonctionnels (Cullen B R *et al.*, 1990). La protéine Tat a donc pour rôle d'augmenter le niveau de la transcription par l'intermédiaire d'un promoteur viral et agit aussi bien sur l'initiation de la transcription que sur l'élongation.

Cependant, l'activation de la transcription peut également être TAR indépendante soit par une liaison directe de Tat sur le NFκB (Dandekar D H *et al.*, 2004),

soit par liaison avec la protéine histone chaperonne hNAP-1 (Vardabasso C *et al.*, 2008). Elle serait régulée par une méthylation au niveau des résidus lysine en position 50 et 51 (Van Duyne R *et al.*, 2008).

A côté de son rôle primaire d'activateur de la transcription de l'expression des gènes viraux, la protéine Tat peut agir comme une toxine virale contribuant à la pathogenèse du SIDA. En effet, elle est libérée de façon active dans le milieu extra-cellulaire par les cellules infectées et peut pénétrer par endocytose dans une variété de cellules dont les macrophages et les lymphocytes T. Ainsi, la protéine Tat sécrétée par les cellules infectées peut non seulement activer la transcription des cellules infectées en état de latence, mais aussi induire l'apoptose des cellules voisines non infectées (macrophages, lymphocytes T) majorant la déplétion en lymphocyte TCD4 et la perte de l'immunocompétence. Différents mécanismes sont mis en cause tels que l'action sur des gènes cellulaires codant pour les cytokines (Westendorp M O *et al.*, 1994), l'activation de Fas ligand (FasL) (Westendorp M O *et al.*, 1995), ou la liaison avec les microtubules Tat qui entraîne la polymérisation des microtubules et s'oppose à leur dépolymérisation (de Mareuil J *et al.*, 2005).

La protéine Tat aurait également une activité, très largement controversée, de régulation sur la transcription inverse de l'ARN en ADNc (Liang C *et al.*, 2002; Kameoka M *et al.*, 2002; Appoloni A *et al.*, 2003; Appoloni A *et al.*, 2007). Tat bloquerait une activité de transcription inverse prématurée qui pourrait survenir avant la formation de particules virales matures en s'associant aux molécules d'ARN néo formées; ceci permet d'assurer l'intégrité des molécules d'ARN à incorporer dans les futures particules virales en empêchant leur dégradation précoce par l'activité Rnase H associée à la TI (Liang C *et al.*, 2002).

### **2-5-2 Le gene *rev* (regulator of expression virus)**

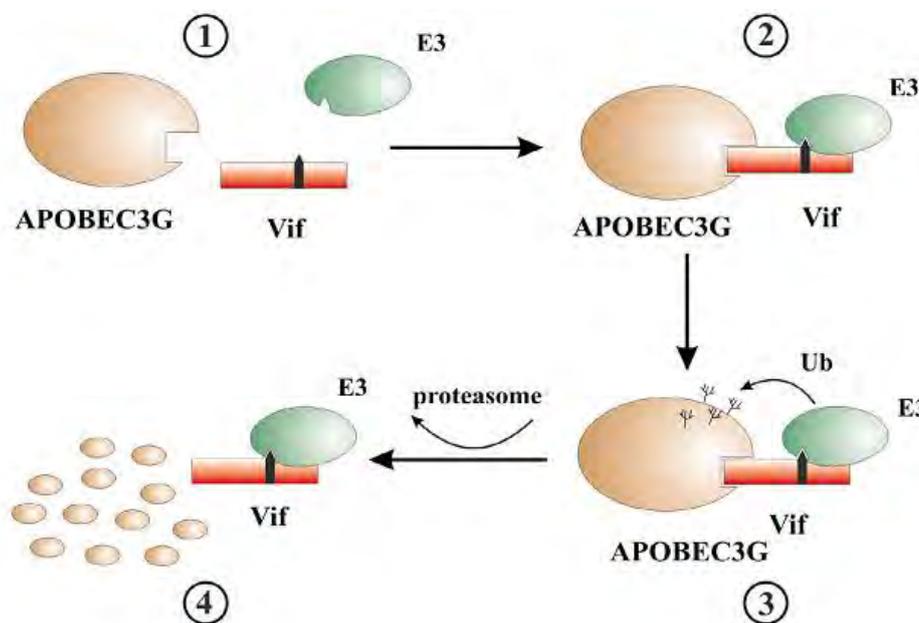
C'est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression du virus. Il code pour la phosphoprotéine pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule-hôte et qui intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure en assurant le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme. Le site de reconnaissance de la protéine sur l'ARN est le domaine RRE (Rev Responsive Element) qui est une séquence du gène *env*, et ce sont plusieurs monomères de Rev qui vont de façon séquentielle se lier au RRE (Pollard V W *et al.*, 1998 ; Pond S J K *et al.*, 2009). Rev est rapidement recyclé entre le cytoplasme et le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NSE).

A côté de cette activité régulatrice de l'expression de gènes, la protéine Rev pourrait intervenir dans l'intégration de l'ADN proviral en contrôlant l'activité de l'intégrase (Rosenbluh J *et al.*, 2007; Levin A *et al.*, 2009). Elle jouerait également un rôle de régulateur

dans la traduction des ARN (Groom H C T *et al.*, 2009) et dans le processus d'encapsidation de l'ARN (Brandt S *et al.*, 2007).

### 2-5-3 Le gène *vif* (viron infectivity factor)

Le gène *vif* code pour une protéine basique de 23kD qui intervient dans l'infectivité des particules virales mais non dans leur production. En l'absence de la protéine Vif, les particules virales produites sont défectueuses alors que la transmission des virus d'une cellule à une autre n'est pas significativement affectée. Cette protéine existe à des taux élevés sous une forme libre dans le cytosol (Li L *et al.*, 2005). Vif est un facteur important car il s'oppose à l'encapsidation d'une protéine cellulaire anti-virale, l'APOBEC3G (Schafer A *et al.*, 2004). Il s'agit d'une cytidine désaminase qui, en entraînant la désamination des desoxycytidine, va être responsable de la formation d'un ADNc de mauvaise qualité qui sera éliminé par le système de réparation de la machinerie cellulaire (Li X Y *et al.*, 2007). Vif, en se liant directement à APOBEC3G (figure 15), favorise sa dégradation par le recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase qui va accélérer sa polyubiquitination et sa destruction par les protéasomes (Goila-Gaur R *et al.*, 2008).



**Figure 15: Modèle de dégradation de APOBEC3G induite par la protéine Vif**

Selon ce modèle, Vif a des sites de liaison pour APOBEC3G et le complexe E3 (1). L'expression de Vif résulte à la formation d'un complexe ternaire APOBEC3G-Vif-E3 (2). La polyubiquitination de APOBEC3G (3) conduit à sa dégradation (4) (Goila-Gaur R *et al.*, 2008).

#### **2-5-4 Le gène *vpr* (viral protein R)**

Il code pour une protéine de 14 kD incorporée dans le virion et qui est localisée dans le noyau. L'encapsidation de cette protéine nécessite une coopération entre la p7 NC et la portion p6 de la polyprotéine Pr55gag. Cette protéine contribue à la pathogenèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR, le transport du complexe de pré intégration dans le noyau, l'arrêt de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose (Le Rouzic E et Benichou S, 2005).

Elle intervient dans le complexe de transcription inverse et influence la fidélité de l'enzyme dont le taux d'erreur est réduit d'environ 4 fois grâce à son interaction avec l'uracil DNA glycosylase (UNG) (Mansky L M *et al.*, 2000 ; Chen R *et al.*, 2004). Elle est présente dans le complexe de pré-intégration et facilite le transport de l'ADN dans le noyau par son interaction avec la machinerie cellulaire responsable du trafic nucléo cytoplasmique (Le Rouzic E *et al.*, 2002). Les molécules de Vpr sont cytotoxiques, elles induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et sont capables d'induire l'apoptose par action directe sur les mitochondries. Un résidu Arginine en position 77 semble jouer un rôle crucial dans la capacité de cette protéine à induire l'apoptose via la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Lum J J *et al.*, 2003; Andersen J L *et al.*, 2008).

#### **2-5-5 Le gène *vpu* (viral protein U)**

Son équivalent est le *vpx* chez le VIH-2. Il code pour une protéine de 81 acides aminés qui s'accroche à la membrane cellulaire via son extrémité N-terminale qui n'est pas retrouvée dans le virion. Cette protéine a 2 fonctions essentielles: la dégradation des molécules de CD4 nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique et la stimulation du relargage des virions hors des cellules infectées.

La protéine Vpu se lie aux molécules de CD4 nouvellement synthétisées et recrute un complexe E3 ubiquitine ligase qui en accélérant sa polyubiquitylation favorise sa destruction par les protéasomes (Schubert U *et al.*, 1998). Cette régulation permet de limiter la liaison CD4-Env au niveau du réticulum endoplasmique (RE) de façon à faciliter l'incorporation des glycoprotéines dans les virions en formation, mais aussi d'empêcher la rétention des virions à la surface des cellules via des interactions CD4-Env (Lama J *et al.*, 1999). La protéine Vpu est également capable de retenir les molécules de CD4 dans le RE par un mécanisme qui pourrait être lié à un signal de rétention dans le RE porté par Vpu qui s'opposerait à la sortie du complexe CD4-Vpu (Magadán J G *et al.*, 2010).

La protéine Vpu stimule le relargage des virions en s'opposant à l'action antivirale d'une protéine cellulaire qui piège les particules virales néo-synthétisées à la surface de la cellule. L'attachement des virions à la membrane cytoplasmique aboutit ainsi à leur internalisation par endocytose plutôt qu'à leur relargage dans le milieu extracellulaire (Neil S J D *et al.*, 2006). Cette protéine cellulaire, décrite sous le nom de «téthérine», est induite par l'interféron alpha et inhibe le relargage des virions en les attachant directement à la surface des cellules (Perez-Caballero D *et al.*, 2009). La protéine Vpu entraîne une déplétion du taux de Téthérine cellulaire en induisant une dégradation protéasomale ou endo-lysosomale (Mitchell R S *et al.*, 2009). Elle peut également détacher la téthérine de la surface des cellules en la redirigeant et en la séquestrant dans un compartiment périnucléaire qui bloque ainsi son activité (Hauser H *et al.*, 2010).

### **2-5-6 Le gène *nef* (negative expression factor)**

Il code pour une protéine très conservée qui est une des premières synthétisées dans les cellules infectées. Cette protéine est retrouvée essentiellement dans le cytoplasme, mais aussi sous forme associée à la membrane plasmique par l'intermédiaire du résidu myristyl. Elle contribue à la pathogenèse du VIH au travers de multiples effets biologiques favorisant la réplication virale, l'infectivité et la persistance (Miller M D *et al.*, 1994, Jeremiah F R et Collins K L., 2006). Un exemple éloquent de l'implication du gène *nef* dans la pathogenèse du VIH est celui des patients progresseurs à long terme qui, étant infectés par des virus présentant une large délétion au niveau du gène *nef*, n'ont présenté des signes d'immunodépression qu'après 14-18 ans (Learmont J C *et al.*, 1999).

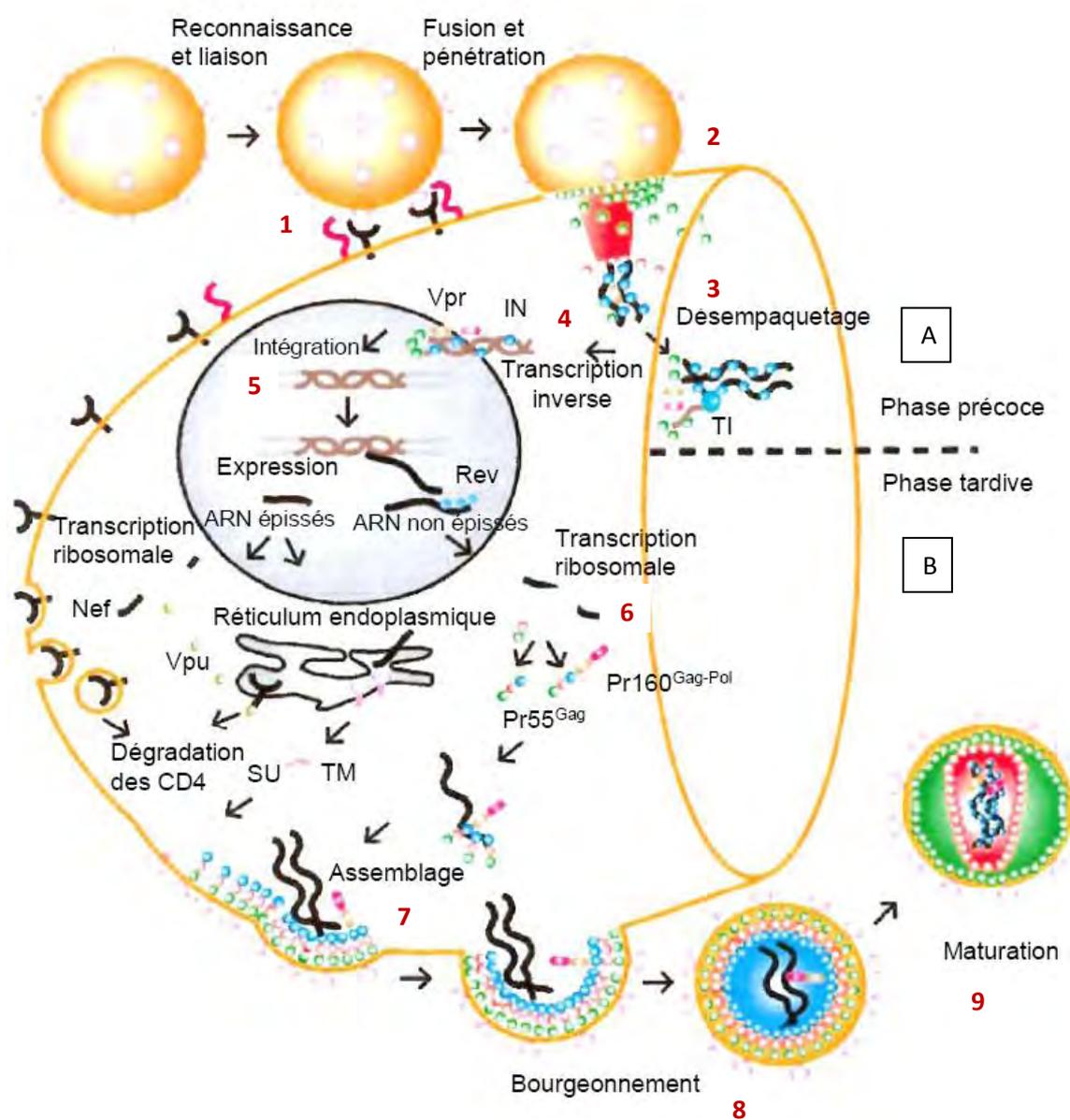
Nef favorise l'infection virale en activant les lymphocytes T CD4 qui deviennent ainsi plus sensibles à l'infection (Baur A S *et al.*, 1994). Elle protège les cellules infectées de l'action des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) voisines (Xu X N *et al.*, 1999, Schaefer M R *et al.*, 2008). Elle prévient l'apoptose des cellules infectées en se liant entre autres au FasL et au tumornecrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), bloquant ainsi la transduction de leur signal apoptotique (Geleziunas, R *et al.*, 2001; Greenway A L *et al.*, 2002).

La protéine Nef augmente la production des particules virales infectieuses en réduisant l'expression du récepteur CD4 qui peut interférer avec le processus de bourgeonnement à travers la membrane et la libération des virions néo formés (Lama J *et al.*, 1999, Schaefer M R *et al.*, 2008), et en améliorant leur infectiosité (Madrid R *et al.*, 2005).

### **3- Cycle de réplication du VIH-1**

La réplication du VIH dans l'organisme a lieu dans de nombreux tissus (ganglions lymphatiques, intestins, thymus, cerveau, etc.) et/ou liquides biologiques (sang, sécrétions génitales, lait, liquide bronchoalvéolaire, etc.), dans lesquels on retrouve les cellules cibles des VIH.

Les principales étapes du cycle répliatif du VIH (figure 16) sont communes à tous les rétrovirus. Leur connaissance est essentielle à la compréhension de la physiopathologie de l'infection VIH, et, surtout, chacune de ces étapes constitue une cible potentielle pour une thérapeutique antirétrovirale (Nielsen M H *et al.*, 2005).



**Figure 16: Phase précoce (A) et phase tardive (B) du cycle de réplication du VIH-1**

(Turner B G et Summer M F, 1999)

Une particule virale vient s'attacher au récepteur CD4 de la cellule cible (1). Elle se fixe à la membrane cellulaire via une reconnaissance du corécepteur pour ensuite être internée par fusion des membranes (2). A lieu ensuite la décapsidation partielle de l'ARN génomique (3) pour être rétro-transcrit (4) en ADN proviral. Le complexe de pré-intégration ainsi formé va migrer dans le noyau pour permettre l'intégration (5) de l'ADN dans le génome de la cellule. Après un certain temps de quiescence, l'ADN proviral va être transcrit en ARN génomique ou ARNm, pour ensuite être traduits (6). Les protéines ainsi produites sont assemblées avec l'ARN génomique pour former le virion (7) qui va bourgeonner de la surface cellulaire (8). Le virion entre finalement dans un processus de maturation qui va le rendre infectieux (9).

## **3-1 Phase précoce**

### **3-1-1 L'attachement de la particule virale à une cellule**

Cette étape nécessite la reconnaissance par l'enveloppe virale (gp120) de molécules de surface cellulaire appelées récepteurs et corécepteurs du VIH (figure 13).

Le récepteur de haute affinité pour le VIH a été identifié, il s'agit de la molécule CD4 (Weiss R A, 2002). Il a été montré plus particulièrement que le premier domaine extracellulaire (domaine V1) de cette molécule possède une forte affinité pour la partie C terminale de la gp120 du virus. Cependant, cette reconnaissance n'est pas suffisante pour l'entrée du virus dans la cellule hôte. Elle est suivie d'un changement conformationnel de la gp120, qui permet la reconnaissance de régions particulières de cette protéine (notamment le domaine V3) par d'autres molécules de surface cellulaire (corécepteurs). Une variété de corécepteurs a été identifiée; il s'agit notamment de molécules dont la fonction habituelle est de reconnaître des facteurs solubles connus sous le nom de chimiokines (substances chimioattractantes) (Weiss R A, 2002). CCR5 et CXCR4 sont les deux corécepteurs majeurs utilisés par le VIH. Selon le corécepteur utilisé, les virus sont dits R5 (utilisation du CCR5, X4 (utilisation du CXCR4) ou R5X4 (virus pouvant utiliser aussi bien CCR5 que CXCR4) (Goodenow M M *et al.*, 2006 ; Robertson D L *et al.*, 2000) . Une délétion de 32 paires de bases au niveau du gène du CCR5 aurait un impact significatif sur l'infection et la progression de la maladie. Les individus qui ont cette délétion et qui sont homozygotes (1%-2% de la population caucasienne), seraient résistants à cette infection (Paxton W A *et al.*, 1996 ; Samson M *et al.*, 1996 ; Liu R *et al.*, 1996 ; Michael N L *et al.*, 1997). Chez les hétérozygotes (20% de la population caucasienne de l'Europe), la progression de la maladie est moins rapide que chez les homozygotes qui n'ont pas cette délétion (Dean M *et al.*, 1996 ; Buseyne F *et al.*, 1998).

L'attachement du VIH à sa cellule cible, va permettre une fusion entre les membranes virale et cellulaire.

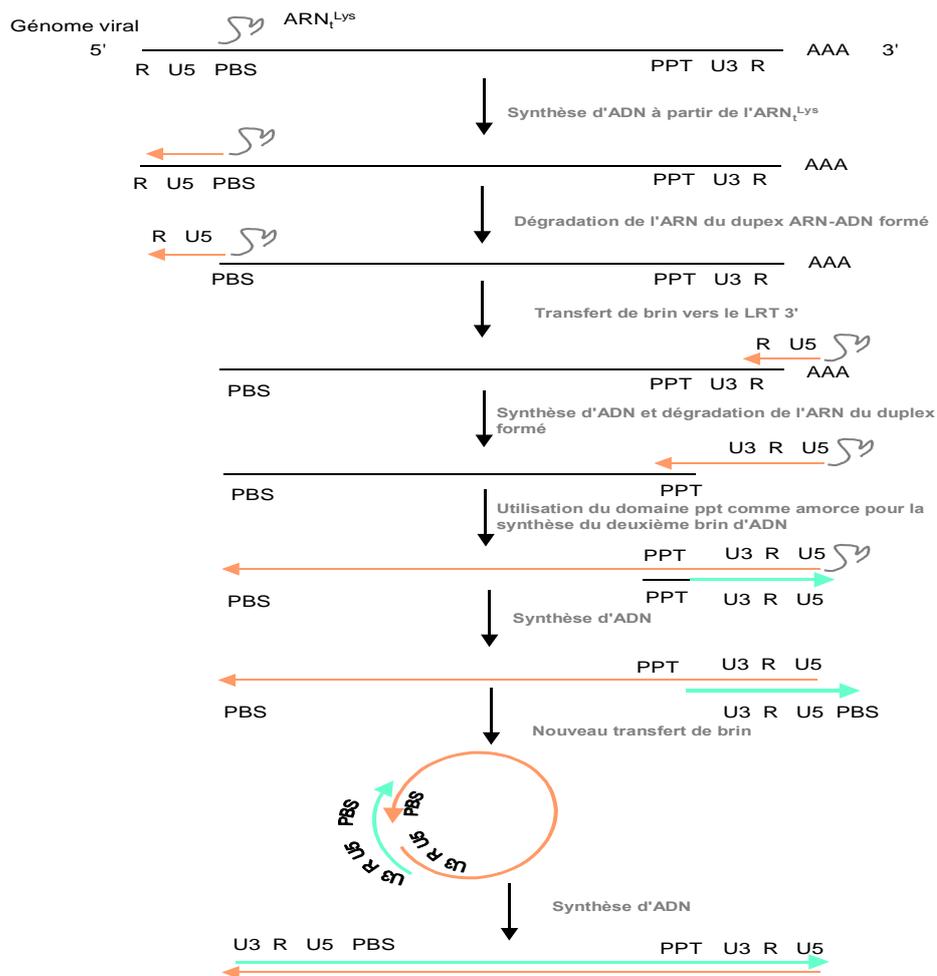
### **3-1-2 La fusion, l'entrée et la décapsidation**

C'est la seconde étape de l'infection, intervenant juste après l'union entre la gp120 et le co-récepteur. Cette union libère la protéine gp41, qui se fixe sur la membrane cytoplasmique. Par repli sur elle-même, gp41 attire l'enveloppe virale vers la membrane cytoplasmique, puis la fusion des membranes cellulaire et virale a lieu grâce à un peptide de fusion présent dans la gp41 (Pierson T C et Doms R W, 2003) (Figure 13).

La capsid du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule; une fois à l'intérieur de la cellule, elle se désagrège, libérant les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contenait. Ainsi, la protéine gp120 est responsable de l'attachement et la protéine gp41 de la fusion, puis de la pénétration au sein de la cellule. D'autres mécanismes d'entrée du virus dans la cellule hôte ont été également décrits. C'est le cas de la pénétration par l'intermédiaire du récepteur Fc des immunoglobulines ou du récepteur pour le complément sous la forme d'un complexe virus-anticorps, ou encore par l'intermédiaire de glycolipides, notamment le galactosylcéramide (Weiss R A, 2002). Enfin, le virus peut également pénétrer dans certaines cellules, comme le trophoblaste placentaire, par endocytose selon une voie CD4-indépendante (Weiss R A, 2002; Nielsen M H *et al.*, 2005). L'ARN viral intégré dans le complexe de rétrotranscription de haut poids moléculaire comprenant au moins la transcriptase inverse, l'intégrase, Vpr, l'ARNt<sup>Lys</sup>, MA et des facteurs cellulaires, va subir en plusieurs étapes une rétrotranscription en ADNc.

### **3-1-3 La transcription inverse**

Cette étape est spécifique aux rétrovirus. En effet, ces derniers ayant pour génome de l'ARN et non de l'ADN, une opération de transcription inverse (ou rétrotranscription) intervient afin de convertir l'ARN viral en une molécule d'ADN en double hélice (figure 17), seule structure compatible avec celle de l'ADN cellulaire dans lequel le génome viral doit être intégré pour assurer la réplication du virus. Cette transcription inverse est réalisée par une enzyme virale: la transcriptase inverse, une ADN polymérase ARN-dépendante (Temin H M et Mizutani S, 1970) associée à l'ARN viral dans la nucléocapside. Tout d'abord, l'ARNt<sup>Lys</sup> qui sert d'amorce, s'attache sur le PBS qui est son site de liaison sur l'ARN génomique ; le positionnement de l'ARNt<sup>Lys</sup> sur la matrice d'ARN serait favorisée par les protéines Vif (Guo F *et al.*, 2007) et Tat (Kameoka M *et al.*, 2002). Le LTR 5' est alors transcrit par la transcriptase inverse et le fragment obtenu va ensuite s'hybrider sur le LTR 3' et servir d'amorce pour la rétrotranscription en ADN du reste de l'ARN viral. La partie RNase H de la transcriptase inverse dégrade alors l'ARN du duplex ADN-ARN ainsi formé à l'exclusion du domaine PPT (pour polyPurine tract sequence) qui sert d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN. La partie LTR3' est alors synthétisée, puis un nouveau transfert de brin permet la synthèse complète de ce deuxième brin. Ces phénomènes de transfert de brin sont sous la dépendance de la protéine Vif présente dans la nucléocapside car ils sont largement inhibés par la protéine antivirale APOBEC3G (Li X Y *et al.*, 2007).



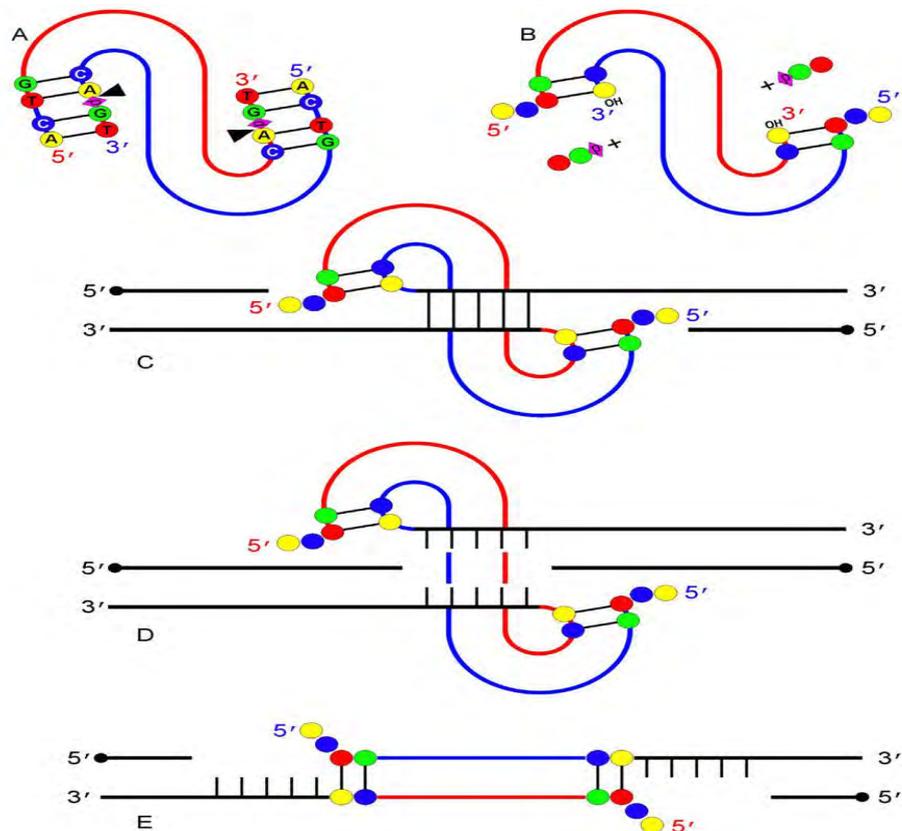
**Figure 17 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral (Nisole S et Saïb A, 2004)**

Cette étape de transcription inverse est une des cibles des traitements anti-VIH par les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse qui bloquent la synthèse du provirus et donc ne permet pas qu'il soit intégré dans le génome de la cellule hôte.

### 3-1-4 L'intégration de l'ADN viral

L'ADN bicaténaire néosynthétisé est associé aux protéines virales MA, TI, IN et Vpr avec lesquelles il forme le complexe de préintégration. Ce dernier ne reste pas dans le cytoplasme, il se dirige vers le noyau grâce à la protéine Vpr qui va permettre sa translocation par son interaction avec un canal ionique de la membrane nucléaire. Des protéines du complexe comme celle de la matrice, de même que des facteurs cellulaires pourraient intervenir, mais leur rôle dans cette étape n'est pas clairement défini (Le Rouzic et Benichou S, 2005 ; Nitahara-Kasahara Y *et al.*, 2007).

Deux réactions sont requises pour assurer l'intégration de l'ADN viral de manière covalente dans celui de la cellule hôte (figure 18).



**Figure 18: Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réplication du virus (Jaskolski M *et al.*, 2009)**

Tout d'abord, l'intégrase se lie à une courte séquence au niveau des LTR et catalyse un clivage endonucléotidique avec élimination d'un dinucléotide aux extrémités de chaque LTR. L'ADN ainsi clivé va alors servir de substrat à la réaction d'intégration ou de transfert de brin conduisant à l'insertion covalente de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée. Cette seconde réaction se produit simultanément aux deux extrémités de la molécule d'ADN viral avec un décalage de cinq paires de bases de part et d'autre des deux points d'insertion. Il s'agit dans les deux cas d'une réaction de trans-estérification en une étape avec rupture d'une liaison phosphodiester par suite d'une attaque nucléophile. Pour compléter le processus d'intégration, l'ADN proviral subit l'action réparatrice des enzymes de l'hôte qui vont permettre la jonction au niveau des extrémités 5' des LTR grâce à un processus de

duplication des séquences de l'ADN cible limitant le provirus intégré (Delelis O *et al.*, 2008). Les sites d'intégration se trouvent principalement dans les unités de transcription actives de l'ADN cellulaire (Mitchell R S *et al.*, 2004). Cette étape d'intégration constitue la cible des anti-intégrase.

### **3-2 Phase tardive**

Elle regroupe toutes les étapes allant de la transcription à partir du provirus intégré, à la libération des virions fils (figure 16).

#### **3-2-1 Transcription, Epissage, Traduction de l'ARN et Maturation des protéines**

Les deux brins d'ADN de la cellule s'écartent localement sous l'effet de l'ARN polymérase. Des bases azotées libres du noyau viennent prendre la complémentarité de la séquence et se polymérisent en une chaîne monobrin, l'ARNm (messager).

L'ARNm ainsi obtenu est hétérogène. En effet, il est constitué d'une succession d'introns (parties non codantes) et d'exons (parties codantes).

Cet ARNm doit subir une maturation pour pouvoir être lu par les ribosomes. Cela consiste à une excision des introns, pour ne laisser que les exons.

Une fois sorti du noyau par l'un des pores nucléaires, l'ARNm est lu par les ribosomes réticulum endoplasmique rugueux. L'ARNm vient en fait se glisser entre les deux sous-unités du ribosome. À chaque codon (groupe de trois nucléotides) de l'ARNm, le ribosome attribue un acide aminé. Les différents acides aminés se polymérisent au fur et à mesure de la lecture. Un codon initiateur AUG (Adénine-Uracile-Guanine) fera débiter la synthèse, tandis qu'un codon stop (UAA; UGA; UAG) en marquera la fin.

Les polypeptides ainsi formés ne sont pas encore opérationnels, ils doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi.

### **3-2-2 Assemblage**

Les protéines de structure du virus (matrice, capsid et nucléocapsid) sont produites sous forme de polyprotéines dénommées polyprécurseurs Gag. Les enzymes virales sont produites elles aussi sous forme de polyprotéines appelées Gag-Pol (Matrice-Capsid-Nucléocapsid-Protéase-Reverse Transcriptase - Intégrase). Lorsqu'elles sortent de l'appareil de Golgi, les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont transportées vers la membrane cellulaire où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires. Les domaines MA (matrice) de Gag et Gag-Pol interagissent avec la membrane, tandis que les ARN viraux sont capturés par les domaines NC (nucléocapsid) de Gag et Gag-Pol (Wills J W et Craven R C, 1991; Göttlinger H G, 2001). Des interactions entre les différents domaines de Gag, en particulier les capsides, permettent l'assemblage d'une structure globulaire conduisant à la formation d'une particule virale par bourgeonnement de la membrane plasmique.

### **3-2-3 Bourgeonnement et Maturation des virus**

La capsid sort de la cellule infectée en arrachant une partie de la membrane cellulaire (à laquelle ont été préalablement fixées les protéines virales de surface (gp120 et gp41)). Il a été mis en évidence que la séparation du virus de la cellule requiert la protéine Vpu qui stimule la libération des virions en s'opposant à l'action antivirale de la téthérine qui piège les particules virales néo-synthétisées à la surface de la cellule (Perez-Caballero D *et al.*, 2009; Hauser H *et al.*, 2010).

Les particules issues du bourgeonnement sont dites immatures. Le virus naissant amorce une modification architecturale qui le fait passer d'un état immature à un état mature. Il s'agit d'un processus protéolytique séquentiel et contrôlé des précurseurs assuré par la protéase virale dont l'activation dépend de la dimérisation de ces molécules et de la présence du précurseur Pr160Gag-Pol (Scarlatà S et Carter C, 2003). Cette auto-activation de la protéase va entraîner la coupure des domaines PR aux alentours, et cette réaction en chaîne va permettre l'activation de toutes les protéases virales. Ces dernières vont ensuite couper les polyprécurseurs Gag et Gag-Pol entre chacun de leurs domaines. Ceci va libérer la matrice de la capsid et de la nucléocapsid, cette dernière restant fixée sur l'ARN viral. Les protéines de capsid, par leurs propriétés intrinsèques d'auto-assemblage, donneront la capsid à la forme conique caractéristique. Dans cette capsid : la nucléocapsid, formée de l'ARN viral, des protéines de nucléocapsid, de la transcriptase inverse et de l'intégrase. Cette étape de maturation virale est essentielle pour rendre les virions infectieux et prêts à infecter de nouvelles cellules.

#### **4- Facteurs de restriction de la cellule hôte**

Ces dernières années ont été marquées par la découverte de facteurs de restriction cellulaire chez les primates capables de limiter la réplication des VIH/SIV après leur entrée dans la cellule hôte. Ces protéines sont; TRIM5alpha, APOBEC3G et Téthérine (Neil S et Bieniasz P, 2009 ; Hammonds J *et al.*, 2012). TRIM5alpha bloque les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1 après pénétration dans les cellules simiennes. APOBEC3G, enzyme à activité cytidine désaminase, provoque une hypermutation lors de la synthèse de l'ADN viral au cours de la rétrotranscription. Ces hypermutations aboutissent à un clivage et à une dégradation du génome viral et/ou à un blocage de la synthèse de protéines virales fonctionnelles. L'activité de ce facteur est cependant neutralisée par une protéine de régulation du VIH, la protéine Vif, qui se fixe à APOBEC3G et entraîne sa dégradation (figure 16). Enfin la téthérine inhibe le bourgeonnement des nouvelles particules virales et empêche ainsi la dissémination du VIH. Toutefois son activité anti-VIH est contrée par la protéine de régulation Vpu et cela par un mécanisme encore mal caractérisé (Hauser H *et al.*, 2010). La découverte de ces mécanismes de défense naturelle des cellules hôtes contre l'infection à VIH ouvre de nouvelles voies de recherche thérapeutique.

Comme précédemment décrit, le cycle de réplication du VIH comporte plusieurs étapes et l'une des étapes clés est la transcription inverse de l'ARN viral en ADN. Cette étape est réalisée grâce à la transcriptase inverse qui est une enzyme dépourvue de mécanisme de correction des erreurs de transcription. Cela a pour conséquence l'émergence de souches virales comportant des différences au niveau de leur génome, induisant ainsi une grande diversité génétique de ce virus, qui a permis de décrire l'épidémiologie générale et moléculaire avec la distribution des différents variants à travers le monde.

## **Chapitre 3- Diversité génétique - Epidémiologie**

### **1- Variabilité génétique du VIH**

La diversité génétique est l'une des caractéristiques majeures du genre lentivirus. Sur la base des distances génétiques entre les VIH-1 retrouvés chez les patients, une classification des VIH-1 en quatre groupes distincts, appelés M, N, O et P a été établie. Le groupe M (majoritaire) regroupe, jusqu'à présent, 9 sous-types VIH-1 (A-D, F-H, J et K). La divergence des nucléotides entre les sous-types du VIH-1 est de 25-30% au niveau du gène *env* alors que dans le gène *pol*, partie la plus conservée chez les rétrovirus, elle est d'environ 9-11% (Santos A F *et al.*, 2010). Certains sous-types sont en plus divisés en sous-groupes libellés sous-sous-types. Les différences génétiques entre les sous-sous-types sont environ 7% au niveau du gène *pol*, et à ce jour seuls deux sous-types sont divisés en sous-sous-types: le sous-type A (A1 à A6) et le sous-type F (F1 et F2) (Bartolo I *et al.*, 2009; Vidal N *et al.*, 2009 ; Meloni S *et al.*, 2004; Gao F *et al.*, 2001; Triques K *et al.*, 1999).

Les analyses de multiples régions du génome et en particulier le séquençage de génomes complets ont permis de montrer que la recombinaison entre sous-types est un événement fréquent. La recombinaison joue un rôle majeur dans l'épidémiologie mondiale du VIH bien que la prévalence des formes recombinantes varie considérablement à travers le monde. Les zones présentant une grande diversité de sous-types, telle que l'Afrique subsaharienne, ont un grand taux de recombinaison en raison des phénomènes courants de co-infections et de superinfection entre deux ou plusieurs souches virales (Li W H *et al.*, 1998). En revanche, les zones comme l'Amérique du Nord où circulent un nombre limité de sous-types ont un faible taux de recombinants (Kijak G H *et al.*, 2005).

Les isolats de recombinants inter-sous-types sont divisés en deux catégories distinctes: ceux qui sont retrouvés dans une population (avec au moins trois personnes sans lien épidémiologique présentant les mêmes points de recombinaison inter-sous-typique) sont appelés forme recombinante circulante (ou CRF, circulating recombinant form) ; à l'inverse, ceux qui ont été isolés chez moins de 3 individus sont appelés forme recombinante unique (ou URF, unique recombinant form). Par conséquent, ces formes ne constituent pas les grandes épidémies ; elles sont plutôt le sous-produit de brassage de multiples sous-types/CRF circulant dans une région donnée (Janssens W *et al.*, 1997).

Actuellement, 55 CRFs (VIH-1) et 1 CRF (VIH-2) ont été caractérisés (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Certains CRF forment des

recombinaisons avec d'autres sous-types ou CRF, donnant naissance aux recombinaisons de seconde génération (SGR, second generation recombinant).

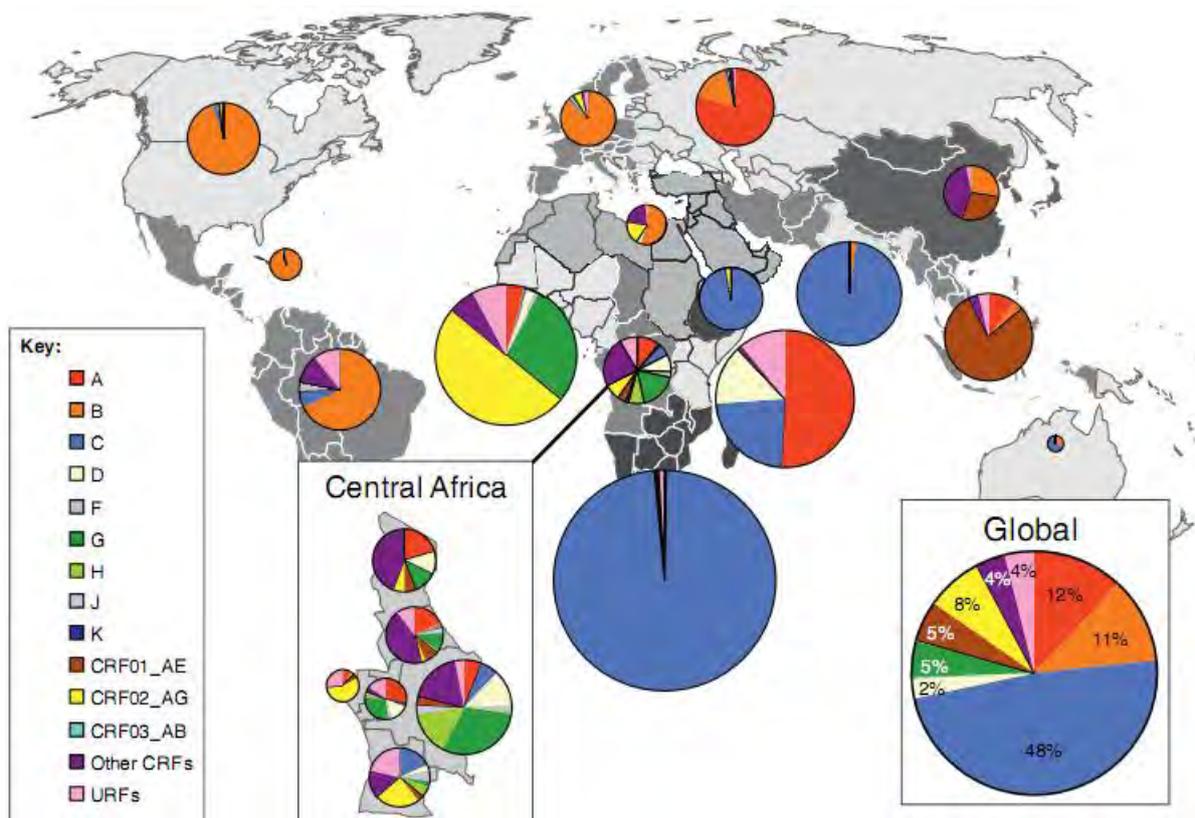
Les VIH-1 du groupe O (Outlier), qui ont été identifiés au Cameroun et au Gabon, sont beaucoup plus rares. Il en est de même des infections par les VIH-1 du groupe N, également identifiés au Cameroun. En 2009, chez une patiente camerounaise, un nouveau variant VIH-1 a été isolé; ce variant, proche du SIVgor, a été classé dans un nouveau groupe: le groupe P (Plantier *et al.*, 2009).

Les VIH-2, sont également classés en sous-types génétiques distincts (A-H). Ces VIH-2 montrent aussi une grande diversité. Le groupe A est retrouvé en Afrique de l'ouest (Damond *et al.*, 2001, Peteers *et al.*, 2003), tandis que le groupe B prédomine en Côte d'Ivoire (Pieniazek *et al.*, 1999 ; Ishikawa *et al.*, 2001). Tous les autres groupes de VIH-2 ont été initialement identifiés chez des individus uniques. Parmi eux, les groupes C, G et H ont été liés aux souches de VISsmm de la Côte d'Ivoire, le groupe D est plus proche d'une souche de VISsmm du Libéria, et les groupes E et F ressemblent aux souches de VISsmm retrouvées en Sierra Leone (Gao *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1996, 1997 ; Santiago *et al.*, 2005 ; Ayouba A *et al.*, 2012).

## **1-1 Répartition des sous-types/CRFs du VIH-1 dans le monde**

La distribution mondiale du VIH-1 est très hétérogène, avec une prévalence régionale de variantes spécifiques (figure 19).

La forme la plus répandue de VIH-1 est le sous-type C qui en 2004 a été responsable d'environ 50% des infections mondiales (Hemelaar J *et al.*, 2012). Il est prévalent dans les pays de l'Afrique australe (avec 2/3 des cas de VIH/SIDA dans le monde), dans les pays de l'Afrique de l'Est, dans la région sud du Brésil, en Inde (zone de forte densité de population) et dans les pays avoisinants. Le sous-type A est très répandu en Europe centrale, en Afrique, en Iran et Europe de l'Est et en Asie centrale. C'est le sous-sous-type A1 qui est la forme la plus répandue, alors que les sous-sous-types A2 et A3 se trouvent principalement en Afrique et rarement en Europe. Le sous-type B est le variant qui a le plus diffusé. Il prédomine dans les pays développés tels que les Etats-Unis, les pays de l'Europe occidentale, le Japon et l'Australie. Les six autres sous-types du VIH-1 (D, F, G, H, J et K) sont relativement peu représentés avec seulement 10% des nouvelles infections en 2004 (Hemelaar J *et al.*, 2006).



**Figure 19 : Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1.**  
 Le camembert avec les pourcentages, représente les proportions relatives de chacun des sous-types/CRF du VIH-1 groupe M identifiés à travers le monde (Hemelaar J *et al.*, 2012).

Concernant les CRFs, certains ont un grand impact sur les épidémies locales de VIH/SIDA, tels que le CRF01\_AE en Asie du Sud et le CRF02\_AG en Afrique de l’Ouest. Le CRF06\_cpx est la deuxième forme recombinante circulante en Afrique de l’Ouest en termes de prévalence alors que les autres CRF ont une implication beaucoup plus faible (Ramirez BC *et al.*, 2008).

Des recombinants de seconde génération ont été également décrits, bien qu’en de faibles proportions, en Afrique de l’Ouest; c’est le cas du CRF02\_AG/CRF06\_cpx au Niger (Mamadou S *et al.*, 2003) et du CRF02\_AG/CRF09\_cpx en Côte d’Ivoire (Toni T *et al.*, 2005).

L’épidémiologie moléculaire du VIH-1 est un processus dynamique dans le temps. Pour exemple, le sous-type C qui ne serait entré au Brésil qu’au milieu des années 1980 (Santos A F *et al.*, 2007; Bello G *et al.*, 2008), et représente 50% des nouvelles infections dans la région sud du Brésil et 5-30% dans les pays voisins (Soares E A *et al.*, 2005 ;

Locatelli D *et al.*, 2007). De même, dans la partie australe et Orientale de l'Afrique, le sous-type C est plus présent que tous les autres sous-types pratiquement en extinction, tels que les sous-types B et D, qui étaient largement représentés dans cette région dans les années 1980 (Williamson C *et al.*, 1995 ; Jacobs G B *et al.*, 2009).

## **1-2 Mécanismes de la diversité génétique**

La diversité génétique est la conséquence de trois facteurs principaux que sont : la faible fidélité de la transcriptase inverse, les pressions de sélection et la recombinaison génétique.

### **1-2-1 Faible fidélité de la transcriptase inverse**

Le taux de mutations très important est lié à la faible fidélité de la transcriptase inverse et au fort taux de réplication. La transcriptase inverse représente le principal facteur générateur de variabilité du génome viral du fait de l'absence d'activité 3'-5' exonucléasique. Elle n'a donc pas de système de corrections d'erreurs survenant au cours de la synthèse de l'ADNc (Bakhanashvili M *et al.*, 2005). Les erreurs sont ainsi fréquentes et sont estimées à une fois tous les 1700 à 10000 nucléotides produits. La taille du génome étant de 9.2kb, il y a approximativement entre 1 et 10 mutations à chaque cycle viral (Preston B D *et al.*, 1988 ; Roberts J D *et al.*, 1988).

La vitesse de réplication du génome est le facteur amplificateur de la survenue de ces mutations. En effet, ce sont environ 10000 virions qui sont produits par jour par chaque virion infectant une cellule et tous les deux jours,  $10^9$  à  $10^{10}$  virions sont renouvelés (Wei X *et al.*, 1995). En théorie, on peut donc prévoir que dans un seul organisme infecté, il y a de multiples variantes qui peuvent diverger d'environ 1 à 5% : il s'agit d'une variabilité intrinsèque donnant des « quasi espèces ».

### **1-2-2 Pressions de sélection**

Elles sont de 2 types, négatives ou positives. Les pressions négatives favorisent les mutations synonymes ou silencieuses, n'entraînant pas de changement d'acide aminé ou de propriétés chimiques de l'acide aminé. Ce type de mutations d'ordre conformationnel et structurel est le plus souvent rencontré sur les gènes sensibles de la particule virale tel le gène *pol* codant les enzymes virales et le gène *gag* codant pour les protéines de structure qui sont les plus conservées (Barbour J D et Grant R M, 2005).

Par opposition, les pressions positives favorisent les substitutions d'acide aminé (mutations non-synonymes). Cette variabilité est très marquée dans le gène de l'enveloppe,

particulièrement la gp120 notamment sa partie la plus variable, la boucle V3 (Zwart G *et al.*, 1993).

Toutes ces pressions qui s'exercent sur le génome entraînent l'accumulation de mutations qui sont le plus souvent fatales pour le virus avec la production de virions incapables de se répliquer correctement et qui sont amenés à disparaître. Cette importante disparition de virions est cependant compensée par le grand nombre de virions produits. Il y'a donc une sélection naturelle qui s'opère et qui ne laisse persister que les virions qui ont la particularité d'être plus résistants aux attaques du système immunitaire.

Le traitement antirétroviral est également un puissant inducteur de pressions de sélections positives en détruisant les virus sensibles et en favorisant l'apparition de variantes résistantes à ces mêmes molécules. C'est pour contrer cette adaptation que les multithérapies visent à «attaquer» le VIH sur plusieurs facettes à la fois, et ainsi à limiter les possibilités du virus à s'adapter à son milieu (Broder S, 2010).

### **1-2-3 Recombinaison génétique**

En raison de sa nature diploïde, le VIH peut augmenter son potentiel de succès évolutif par recombinaison. La recombinaison peut se produire quand une cellule est infectée avec 2 virus génétiquement distincts lors d'un événement encore appelé surinfection. Elle survient lorsque les sauts de la TI, d'un brin à un autre au cours de la rétro-transcription, permettent de générer une séquence d'ADN nouvellement synthétisé qui est un recombinant entre les deux génomes parentaux. Le nouveau virus recombinant est donc une mosaïque contenant des séquences provenant de plusieurs génomes parentaux. Ce phénomène de recombinaison entre 2 souches distinctes peut se produire dans les 2 semaines qui suivent l'infection (Wooley D P *et al.*, 1997) et le VIH subirait 2 à 3 événements de recombinaison par génome par cycle de réplication (Jetzt A E *et al.*, 2000). Ce phénomène de recombinaison peut intéresser des virus d'un même sous-type (recombinaison intra sous-type) mais elle est plus évidente quand elle se produit entre sous-types différents (recombinaison inter sous-types).

L'infection à l'origine de la recombinaison peut résulter de l'adoption simultanée de virus multiples au cours d'un événement unique de transmission (co-infection) ou d'un passage séquentiel des virus suite à de multiples événements de transmission (superinfection) (Blackard J T *et al.*, 2002).

La proportion élevée de cas d'infection par le VIH attribuables à des virus recombinants dans le monde, et la forte probabilité d'événements de recombinaison dans

chaque cycle de réplication montre que ce mécanisme est un moyen efficace et une méthode rapide permettant au virus d'évoluer. Par exemple, la recombinaison rétrovirale peut permettre la mise en place simultanée d'un grand nombre de modifications génétiques. Ces changements peuvent modifier le tropisme cellulaire, la pathogénicité virale, la sensibilité aux médicaments antirétroviraux, la précision des tests courants de diagnostic sérologique et de biologie moléculaire et la progression de la maladie (Blackard J T *et al.*, 2002).

Cette diversité génétique a un impact sur la transmission du virus, le diagnostic et la détermination de la charge virale, la réponse au traitement et la résistance aux molécules ARVs, mais aussi sur la prévention contre l'infection.

### **1-3 Conséquences de la diversité génétique**

La diversité génétique du VIH a un effet sur chaque aspect de la pandémie.

#### **1-3-1 Conséquences sur la transmission et la progression de la maladie**

Dans les zones géographiques où plusieurs sous types du VIH circulent et se recombinent, des différences entre eux ont été observées dans le moment et le taux de transmission. Il a été suggéré que les différences géographiques des prévalences de la transmission verticale seraient liées à la diversité génétique au niveau de ces régions. (Odaibo G N *et al.*, 2006; Pádua E *et al.*, 2009). Les sous types et formes recombinantes du VIH auraient des différences phénotypiques et fonctionnelles, incluant l'usage de co-récepteurs, le fitness viral, et la charge virale qui influent sur la disparité des taux de TME (Hu D J *et al.*, 2001 ; Jeeninga R E *et al.*, 2000 ; Kaleebu P *et al.*, 2002 ; Neilson J R *et al.*, 1999 ; Tscherning C *et al.*, 1998 ; Blackard J T *et al.*, 2000 ; Renjifo B *et al.*, 2001 ; Renjifo B *et al.*, 2004). Dans l'étude menée par Renjifo en Tanzanie, il a montré que la TME était plus fréquente chez les mères tanzaniennes infectées par des virus ayant l'enveloppe du sous type C, par rapport aux virus ayant l'enveloppe des sous types A ou D (ou recombinant A/D) (Renjifo B *et al.*, 2004). Au Kenya, Yang *et al.* ont montré que la TME était plus fréquente chez les mères infectées par le sous types D ou le recombinant A/D comparait au sous type A. (Yang C *et al.*, 2003). Dans une autre étude basée sur les régions C2-C5 de l'enveloppe et 5'LTR, Renjifo *et al.*, ont montré que des formes recombinantes étaient préférentiellement transmis durant l'allaitement (Koulinska I N *et al.*, 2006).

La diversité génétique a aussi des influences sur la transmission sexuelle. Durant une étude menée en Ouganda, des chercheurs ont pu montrer que le sous-type A était associé à un

taux plus élevé de transmission hétérosexuelle que le sous-type D (Kiwanaku N *et al.*, 2009). D'autres études en Ouganda et au Kenya ont montré une diminution de la proportion du sous-type D et une augmentation dans le cas du sous-type A (Rainwater S *et al.*, 2005 ; Conroy SA *et al.*, 2010). Ces changements observés dans les proportions de sous-type A et D, sont en accord avec la progression plus rapide de la maladie et le taux plus faible de transmission hétérosexuelle liés au sous-type D, par comparaison au sous-type A.

Le rôle de la diversité génétique du VIH dans la progression de la maladie a été élucidé à partir d'études menées sur des cohortes vivant dans des régions où circulent différents sous-types, en particulier en Afrique de l'Est. Des études menées en Ouganda, en Tanzanie et au Kenya ont toutes montré que l'infection par le sous-type D est associée à une progression vers la mort plus rapide que le sous-type A dans des populations où co-circulent ces sous-types (Kaleebu P *et al.*, 2002 ; Kiwanuka N *et al.*, 2008 ; Lutalo T *et al.*, 2007 ; Baeten J M *et al.*, 2007 ; Vasan A *et al.*, 2006). La réduction de la survie était associée à un taux de CD4 bas pour l'infection au sous-type D comparait au sous-type A (Kaleebu P *et al.*, 2002 ; Baeten J M *et al.*, 2007 ; Vasan A *et al.*, 2006 ; Kiwanuka N *et al.* 2010). Dans une étude européenne, il a été montré que l'infection avec le sous-type D entraînait un taux de diminution des CD4 en absence de traitement ARV, 4 fois plus élevé, comparait aux autres sous-types étudiés (A, B, C et CRF02\_AG, qui avaient des taux de diminution des CD4 semblables) (Easterbrook P J *et al.*, 2010).

### **1-3-2 Impact sur le diagnostic et la mesure de la charge virale**

L'expansion de la diversité génétique du VIH soulève des problèmes relatifs à l'efficacité des tests de diagnostic aussi bien sérologiques que moléculaires. Les tests de détections d'anticorps et d'acides nucléiques sont respectivement basés sur la présence d'épitopes spécifiques et de séquences géniques, pour identifier la présence du VIH. Les formes virales qui n'ont pas ces épitopes ou séquences spécifiques, vont induire un défaut de diagnostic (Aghokeng A F *et al.*, 2009 ; Lee S *et al.*, 2007). Dans une étude menée au Cameroun, des tests de diagnostic sériques et moléculaires réalisés sur des échantillons de patients ont montré des discordances entre les différentes plateformes. Des échantillons ayant donné des résultats positifs avec des tests de diagnostic sérologique ont montré des résultats négatifs avec des tests moléculaires (Lee S *et al.*, 2007). Bien que la plupart des tests immuno-enzymatiques et des tests rapides actuels soient sensibles et spécifiques pour le diagnostic des infections chroniques liées aux sous-types du VIH-1 groupe M (Koch W H *et al.*, 2001 ; Parry J V *et al.*, 2003 ; Rouet F *et al.*, 2004) quelques difficultés subsistent dans le

diagnostic de personnes récemment infectées avec les sous-types non-B principalement parce que les antigènes utilisés pour ce diagnostic ont été développés sur la base du sous-type B (Louie B *et al.*, 2008). Cela montre l'importance de prendre en compte la diversité génétique au niveau d'une zone géographique donnée lorsqu'il faut choisir les tests de diagnostic à utiliser, surtout en ce qui concerne le diagnostic néonatal dans le cadre de la TME. Les séquences géniques générées lors des surveillances et des études de caractérisation à l'échelle mondiale, vont permettre de développer, d'évaluer et de valider les tests de diagnostic sérologiques et moléculaires, afin de résoudre ce problème de diversité génétique en veillant à ce que des formes émergentes n'échappent pas à la détection par ces tests (Brennan C A *et al.*, 2006 ; Parry J V *et al.*, 2003 ; Sickinger E *et al.*, 2004 ; Louie B *et al.*, 2008).

En plus de son influence sur le diagnostic, la diversité génétique a aussi des conséquences sur la charge virale qui constitue un élément important dans le suivi de l'infection à VIH. Les techniques commerciales utilisées pour la quantification de cette virémie ont beaucoup évolué avec l'avènement de l'amplification en temps réel, et de nos jours les plateformes sont de plus en plus automatisées. Cinq trousseaux commerciaux sont disponibles : CobasAmplicor HIV-1 Monitor v1.5<sup>®</sup> (Roche Molecular Diagnostics), CobasTaqMan<sup>®</sup> (Roche Molecular Diagnostics), Real Time HIV-1<sup>®</sup> (Abbott Diagnostics), NucliSensEasyQ v1.2<sup>®</sup> (Biomérieux), Generic HIV Charge virale<sup>®</sup> (Biocentric) et le Quantiplex HIV bDNA<sup>®</sup> (Siemens). Les capacités de ces tests à quantifier la charge virale plasmatique d'une infection due à un sous-type non B continuent de faire l'objet de nombreuses études et beaucoup de progrès ont été faits pour améliorer la sensibilité de ces tests de manière à quantifier tous les sous-types du VIH-1, aussi bien sur le plasma que sur des spots de sang séchés sur papier filtre (Berger A *et al.*, 2005 ; Pan P *et al.*, 2007 ; Choi J Y *et al.*, 2009 ; Garrido C *et al.*, 2009 ; Rouet F *et al.*, 2010 ; Kane *et al.*, 2008). La technologie de Abbott real Time HIV-1 et la nouvelle version de TaqMan v2.0 sont les essais disponibles à ce jour, pouvant quantifier quelques souches du groupe O (Swanson P *et al.*, 2007 ; Sizmann D *et al.*, 2010) alors que le NucliSensEasyQ arrive à quantifier le VIH-2 du groupe A (Rodés B *et al.*, 2007). Ainsi, l'évaluation périodique des tests de charge virale est essentielle parce que la distribution des sous-types est un processus dynamique.

La découverte de nouvelles variantes et l'assurance que les tests les détectent sont des défis, étant donné que la non détection ou une mauvaise détection peuvent engendrer des valeurs de charge virale faibles erronées, pouvant avoir des répercussions sur le traitement et la prise en charge de façon globale.

### **1-3-3 Impact sur la réponse au traitement ARV et la résistance**

L'impact de la diversité génétique sur la réponse au traitement est une question cruciale car les molécules ARV ont été mises au point sur la base des souches B alors que plus de, 90% des cas de VIH sont dus à des sous-types non B (Hemelaar J *et al.*, 2012). Il est établi que les souches de VIH-1 groupe O et le VIH-2 sont naturellement résistantes aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (Descamps D *et al.*, 1997 ; Shih C K *et al.*, 1991).

Des études limitées *in vitro* ont suggéré que certains sous-types non B peuvent-être moins sensibles à certaines catégories de médicaments antirétroviraux. Par exemple, les souches du sous-type G sont moins sensibles *in vitro* aux inhibiteurs de protéase (Descamps D *et al.*, 1998). Le polymorphisme au niveau de la protéase des souches non-B avait également fait supposer la possibilité d'acquisition d'une résistance précoce par rapport aux souches B mais à ce jour, aucune étude n'a montré l'influence négative de ce polymorphisme sur le résultat clinique d'une trithérapie (Velazquez-Campoy A *et al.*, 2002 ; Frater A J *et al.*, 2001). Généralement, il semble que les sous-types de VIH-1 n'entraînent pas de grandes différences dans la réponse au traitement antirétroviral ; le niveau de réponse au traitement antirétroviral (diminution dans le plasma de la charge virale et augmentation du nombre de cellules CD4) chez les patients africains infectés par des souches non-B est comparable à des réponses signalées chez les patients infectés par le sous-type B dans les pays occidentaux. Cependant, le polymorphisme d'une souche peut orienter les voies génétiques d'acquisition de la résistance (Laurent C *et al.*, 2002 ; Frater A J *et al.*, 2002). Les conséquences sont aussi perceptibles dans les stratégies de prévention.

### **1-3-4 Impact sur la prévention**

L'intervention idéale pour le contrôle de la pandémie du VIH est le développement de stratégies de prévention telle qu'un vaccin efficace. La diversité génétique du VIH reste l'un des obstacles majeurs à la découverte d'un tel outil préventif efficace. Des efforts ont été effectués dans ce sens, mais les résultats restent peu satisfaisants pour une bonne protection contre l'infection.

Des virus inactivés aux virus atténués, les résultats peu satisfaisants et peu sécurisants chez les macaques n'ont pas permis l'expérimentation chez l'homme (Watkins D I *et al.*, 2008; Mansfield K *et al.*, 2008).

Des stratégies d'induction d'anticorps neutralisants avec les enveloppes recombinantes ou des peptides de l'enveloppe du VIH ont donné des résultats encourageants chez le chimpanzé qui n'ont cependant pas été confirmés dans des modèles macaques et surtout dans un large essai de phase III en Thaïlande (McCarthy M *et al.*, 2003 ; Cohen J *et al.*, 2003).

Diverses combinaisons de vecteurs recombinants ont permis de protéger les macaques exposés secondairement au virus pathogène, non contre l'infection mais contre le SIDA, en limitant la réplication virale. Cependant, l'essai STEP (de phase IIb) utilisant l'adénovirus-5 (Ad5) recombiné avec les gènes *gag*, *pol* et *nef*, fut interrompu du fait d'un taux supérieur d'infections chez les volontaires vaccinés par rapport au bras placebo, sans qu'une réduction de la charge virale ne soit observée (Buchbinder S *et al.*, 2008).

L'essai de phase III RV144 n'a pas été non plus un grand succès ; il a utilisé le concept du « prime boost » c'est-à-dire en préparant la réponse immunitaire par l'administration d'un vecteur recombinant CanaryPox (Alvac) et en la « boostant » par l'injection de la protéine d'enveloppe gp120 (Aidsvax). Conduit sur 16000 volontaires thaïlandais elle n'a montré qu'une réduction modeste (31%) bien que significative des infections à VIH chez les vaccinés par rapport au groupe placebo (Rerks-Ngarm S *et al.*, 2009).

Du fait des nombreux échecs des stratégies visant à induire une immunité à médiation cellulaire, la recherche sur les anticorps a repris et des études récentes montrent la place importante des anticorps neutralisants dans la réponse immunitaire (Blish C A *et al.*, 2008 ; Scheid J F *et al.*, 2009; Scheid J F *et al.*, 2011 ). En effet, pour être efficace, un vaccin contre le VIH devrait pouvoir stimuler à la fois une immunité protectrice à médiation cellulaire et des anticorps spécifiques qui cibleraient des régions conservées du virus. L'espoir est ainsi en train de renaître depuis la découverte d'anticorps neutralisants (Walker *et al.*, 2009; Wu X *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011). Cette découverte représente ainsi un espoir réel pour le vaccin car il s'affranchit de la diversité génétique en sélectionnant des sites d'immunisation conservés d'une souche virale à l'autre (Zhou T *et al.*, 2010). Cet espoir est d'autant plus substantiel lorsque l'immunité à médiation cellulaire est aussi prise en compte (McDermont *et al.*, 2012).

Pour étudier la diversité génétique, on utilise des techniques basées sur la biologie moléculaire ou la réaction antigène/anticorps.

## **1-4 Méthodes d'étude de la diversité génétique**

Pour déterminer un sous-type viral, les techniques moléculaires sont les méthodes de choix à côté des techniques sérologiques basées sur des réactions immunoenzymatiques. On distingue la HMA (Heteroduplex Mobility Assay), la MHA (Multi Hybridization Assay), et surtout l'analyse phylogénétique qui nécessite cependant de disposer tout d'abord d'une séquence nucléotidique ou protéique de l'échantillon à étudier. Pour cela, l'amplification génique par PCR est aujourd'hui la technique la plus couramment utilisée en amont de la réaction de séquençage nucléotidique. La détermination d'un génotype par séquençage suivi d'analyses phylogénétiques paraît être la technique la plus précise mais aussi la plus onéreuse.

### **1-4-1 Détermination du génotype par analyse phylogénétique**

Pour cette technique, il est nécessaire de disposer d'abord d'une séquence nucléotidique ou protéique de l'échantillon à étudier. Pour cela, l'amplification génique par PCR est effectuée en amont de la réaction de séquençage. Le génotypage par séquençage est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable, mais elle est également la plus coûteuse.

#### **1-4-1-1 Séquençage nucléotidique**

C'est la méthode de référence dans l'étude de la diversité génétique du VIH. Tout d'abord, une amplification génique est réalisée le plus souvent par PCR d'un ou de plusieurs gènes que l'on souhaite étudier, à partir de l'ADN proviral ou de l'ADN complémentaire (ADNc obtenu par rétrotranscription de l'ARN viral). La méthode de séquençage la plus utilisée actuellement, est la méthode de Sanger automatisée réalisée avec des didéoxynucléotides, terminateurs de chaîne (Sanger F *et al.*, 1977). Les fragments obtenus sont par la suite séparés par électrophorèse sur un séquenceur.

Les techniques de séquençage standard ne permettent de séquencer que les populations virales présentes à des proportions  $\geq 15-25\%$  de la population virale globale. Les populations virales présentes à faible quantité et appelées variants minoritaires, ne peuvent pas être détectées par ces techniques standard. Pour atteindre ces populations virales minoritaires, des techniques plus sensibles telles que le séquençage ultra sensible ont été développées (Hauser A *et al.*, 2012 ; Pilger D *et al.*, 2011 ).

Les outils de séquençage nucléotidiques ont été améliorés, et on parle aujourd'hui des NGS (New Generation Sequencing, ou Séquençage Nouvelle Génération). Il s'agit de techniques de séquençage à haut débit, qui permettent de disposer d'un grand nombre

d'informations en un temps court (Zhang J *et al.*, 2011). Ces nouvelles techniques sont de plus en plus utilisées dans les études de diversité génétique (Beerenwinkel N *et al.*, 2012).

Après édition des séquences pour s'assurer de leur qualité, les informations contenues dans celles-ci se prêtent alors à l'analyse phylogénétique par comparaison avec des séquences de référence.

#### **1-4-1-2 Notions de phylogénie moléculaire**

La phylogénie moléculaire utilise la comparaison des séquences pour établir les liens génétiques des isolats et comprendre leur évolution depuis une hypothétique séquence ancestrale. Ces liens sont traduits par des reconstructions appelées arbres phylogénétiques, caractérisés par leur topologie (position des nœuds) et leur longueur (somme de la longueur des branches). Les nœuds représentent les ancêtres communs, et la longueur des branches le temps d'évolution. La distance génétique peut être définie comme étant le nombre de substitutions réalisées au cours de l'évolution entre deux séquences (dissimilarité), rapporté au nombre de sites des séquences. Cependant, la base de ces analyses est l'alignement des sites homologues : des gènes, ou des sites dans des gènes sont homologues s'ils dérivent d'un ancêtre commun. C'est un point primordial car un mauvais alignement conduit à des résultats erronés. Il existe deux grands types de méthodes permettant la reconstruction d'arbres phylogénétiques :

- les méthodes basées sur les mesures de distances entre séquences prises deux à deux, c'est à dire le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre ces deux séquences,
- les méthodes basées sur les caractères qui s'intéressent au nombre de mutations (substitutions / insertions / délétions) qui affectent chacun des sites (positions) de la séquence.

##### **➤ Méthodes basées sur le calcul des distances génétiques**

La distance génétique est le nombre de substitutions réalisées au cours de l'évolution entre deux séquences (dissimilarité), rapporté au nombre de sites des séquences. La distance évolutive vraie est estimée par différents moyens statistiques et mathématiques, dont la méthode de calcul de Kimura à deux paramètres. Cette méthode part de l'hypothèse préalable que les sites de deux séquences évoluent indépendamment, à la même vitesse, et que les substitutions se produisent selon deux fréquences, l'une pour les transitions (A $\leftrightarrow$ G, C $\leftrightarrow$ T), l'autre pour les transversions (purine $\leftrightarrow$ pyrimidine), les transitions se produisant deux fois plus que les transversions. La distance est donc basée sur le calcul de ces fréquences de transitions et de transversions, observées entre deux séquences (Kimura M, 1980).

Une des méthodes couramment utilisée, basée sur les matrices de distance, est la méthode "Neighbor Joining" (méthode du plus proche voisin). Elle consiste à optimiser les branchements, non en choisissant parmi les arbres en fin de construction mais à chaque étape, en calculant une nouvelle matrice dans laquelle figurent les distances modifiées. Pour cela, est retirée à chaque distance entre deux espèces la moyenne des distances de chacune de ces deux espèces à toutes les autres (Saitou N *et al.*, 1987).

➤ **Méthodes fondées sur les caractères**

Elles utilisent aussi une matrice, mais cette fois de caractères (matrice de caractères discrets) : l'état des sites est précisé pour chaque espèce. Ces méthodes sont très lentes mais elles ont l'avantage d'être précises.

La méthode de « parcimonie maximum » recherche le réseau le plus économique en substitutions, permettant ainsi le choix du réseau ayant la longueur totale la plus courte. Cette méthode examine tous les sites nucléotidiques, mais ne conserve que les sites favorisant le passage d'une séquence à l'autre par le nombre le moins élevé de mutations, le site considéré est dit informatif et sera utilisé pour l'analyse (Sourdis J *et al.*, 1988).

La méthode du "Maximum Likelihood" (maximum de vraisemblance) prend en compte tous les sites nucléotidiques séparément. Pour chaque événement (embranchement, distance entre deux noeuds), est calculée la probabilité d'avoir cet événement (vraisemblance). L'arbre construit sera celui dont les embranchements positionnant les différentes séquences seront les plus probables (Felsenstein J, 1981). Cette méthode est considérée comme la plus fiable de toutes les méthodes phylogénétiques, celle qui conduit au résultat le plus proche de l'arbre évolutif réel. Par contre, c'est la méthode qui demande la plus grosse puissance de calcul et prend le plus de temps.

➤ **Supports statistiques des résultats: valeur de Bootstrap**

C'est la méthode la plus souvent utilisée pour tester la fiabilité des branches internes. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise, donc dans chaque réplique de bootstrap certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplique produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. On applique généralement 100 à 1000 ré-échantillonnages. Les valeurs de Bootstrap représentent le nombre de fois où, parmi les arbres générés, l'on obtient le même embranchement. Plus cette valeur est élevée, plus la solidité de l'embranchement est assurée. En dessous d'une certaine valeur (en général, 70 %),

la branche n'est pas considérée comme fiable (Sitnikova T, 1996). Pour le maximum de vraisemblance, on considère généralement que les branches définies par une valeur de Bootstrap > 95% sont fiables et il faut 1000 réplifications de Bootstrap pour que cette méthode soit statistiquement valable.

#### ➤ **Analyse des recombinaisons**

Il arrive que certaines souches ne se lient pas de manière consistante (*Bootstrap* < 70), Dans ce cas, une analyse le long de ces séquences est nécessaire. Des programmes permettent de réaliser de façon automatique les analyses en « découpant » les alignements en fragments chevauchants successifs le long des séquences, puis en calculant les arbres correspondant à ces fragments. Les résultats sont présentés sous forme graphique avec des courbes correspondant aux valeurs de *Bootstrap*. L'évolution des courbes permet d'estimer les points de recombinaison et les profils. Cependant cette analyse requiert des tailles de fragments supérieures à 1000 pb (Posada D, 2001).

De nombreux programmes informatiques existent parmi lesquels : Diversity plotting, Rega (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>), Simplot et Bootscanning (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/>)

- "Diversity plotting" permet d'estimer le pourcentage de diversité entre les paires de séquences sélectionnées en considérant une fenêtre de 300 à 500 pb sur un alignement après avoir défini un incrément de paire de bases d'environ 20 paires de base (pb). Ce programme permet d'établir un graphique des comparaisons des distances génétiques entre la séquence à analyser et les séquences de référence.
- Le programme "Simplot" (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/>) calcule la similarité (%) de la séquence à analyser par rapport aux références le long de l'alignement. Plus ce pourcentage est élevé, plus l'appartenance d'une souche à un groupe de virus de référence est probable.
- Le "Bootscanning" est une analyse basée sur le même principe que le Simplot avec comme particularité le fait qu'il engendre des arbres le long d'un alignement sur des fenêtres avec un incrément constant. Elle indique au cours de l'analyse une valeur de "bootstrap" pour chaque arbre produit ; les différences dans la position de la souche à analyser indiquent une recombinaison possible (Salminen M O *et al.*, 1995).

#### **1-4-2 Génotypage par HMA ou « Heteroduplex Mobility Assay »**

C'est l'une des méthodes alternatives d'étude de la diversité génétique des souches de VIH. Elle est basée sur l'analyse électrophorétique des hétéroduplexes (Delwart E L *et al.*, 1993 ; Heyndrickx L *et al.*, 2000). La partie V3-V5 du gène gp120 ou la p24 du gène gag est amplifiée et hybridée avec un produit homologue obtenu à partir d'un plasmide. Ces plasmides sont des références de chaque soustype ou recombinant connu. Après hybridation, les hybrides obtenus sont analysés par électrophorèse. Si la souche à analyser s'hybride sur toute sa longueur avec la référence, l'hybride obtenu migrera plus vite sur un gel d'agarose par rapport à un hybride hétérozygote. En effet, si la souche est différente de la référence, il se forme une boucle au point de divergence génétique et ce défaut d'appariement se traduit par des anomalies de mobilité. L'analyse de cette mobilité permet de décider de quel groupe le virus étudié est le plus proche. Cependant, cette technique présente quelques inconvénients car elle nécessite une mise à jour permanente des plasmides. Aussi, ne permet-elle pas de différencier certaines souches ; c'est en effet le cas du CRF02\_AG (A dans V3-V5) et du soustype A.

#### **1-4-3 Génotypage par MHA ("Multi-region Hybridation Assay")**

Le MHA a pour but de caractériser les sous-types ou recombinants et de détecter de potentielles doubles infections après amplification de plusieurs régions génomiques du VIH-1 (par exemple, *gag*, *pol*, *vpu*, *nef*, *tat*) (Hoelscher M *et al.*, 2002). Il s'agit d'une technique d'hybridation basée sur la reconnaissance sonde –séquence cible spécifique utilisant la PCR en temps réel. Elle est utilisée avec succès dans les zones où circule un nombre limité de sous-types comme la Tanzanie (A, C et D) ou l'Amérique latine (B, F et CRF\_BF) (Herbinger K H *et al.*, 2006 ; Hierholzer J *et al.*, 2002). Elle représente un plus gros challenge pour l'Afrique de l'Ouest et du Centre du fait de la circulation d'une multitude de sous-types/CRF (Vidal N *et al.*, 2013 ; Ndiaye O *et al.*, 2010).

#### **1-4-4 Sérotypage**

C'est une technique ELISA qui a montré un haut degré d'efficacité pour différencier les VIH-1 des VIH-2 et reste très utile pour le diagnostic des infections à groupes N et O (Depatureaux A *et al.*, 2010 ; Vallari A *et al.*, 2010). Cependant elle est moins sensible quant à sa capacité à différencier les sous-types au sein du groupe M (Plantier J C *et al.*, 1999).

Grâce aux outils de biologie mis en place, et aux études épidémiologiques, la répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH peut être connue. A cet effet, des rapports épidémiologiques sont annuellement établis par des organismes comme l'ONUSIDA.

## **2- Epidémiologie de l'infection à VIH**

En 2011, selon le rapport de l'ONUSIDA de 2012, le nombre total de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine était estimé à 34 millions. Durant cette année, 330 000 enfants ont été infectés (voir chapitre 4). L'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec près d'1 adulte sur 20 (4,9 %) vivant avec le VIH, ce qui représente 69 % des personnes vivant avec le VIH dans le monde (ONUSIDA, 2012).

Il y a donc une hausse continue du nombre de personnes infectées même si le nombre de personnes nouvellement infectées est inférieure de près de 20% à celui de 2001. La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie mais environ 5 millions de personnes vivent avec le virus dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-Est et de l'Est. Après l'Afrique subsaharienne, les régions les plus fortement touchées sont les Caraïbes, l'Europe de l'Est et l'Asie centrale, où 1 % des adultes vivait avec le VIH en 2011.

Dans ce même rapport, le nombre de décès estimé à 1,7 millions représente une baisse de 24% du nombre de décès dus au SIDA en 2005. Cela a été possible grâce à l'élargissement et à l'intensification des traitements antirétroviraux. Le nombre de décès liés au sida en Afrique subsaharienne a diminué de 32 % de 2005 à 2011, malgré le fait que la région représentait encore 70 % du nombre total des décès dus au sida en 2011. Les Caraïbes (48 %) et l'Océanie (41 %) ont enregistré une baisse considérable du nombre de décès liés au sida entre 2005 et 2011. Des baisses moins spectaculaires ont été observées au cours de la même période en Amérique latine (10 %), en Asie (4 %) ainsi qu'en Europe de l'Ouest, en Europe centrale et en Amérique du Nord (1 %).

Au Sénégal, l'épidémie du VIH est de type concentré avec une prévalence faible qui était de 0,9% en 2011 dans la population générale (CNLS, 2013). Cependant, les résultats des enquêtes sur les groupes à risque montrent des prévalences beaucoup plus élevées. Quand on prend l'exemple des travailleuses du sexe, cette prévalence était de 19% en 2010 (CNLS, 2012). La population pédiatrique n'est pas épargnée par cette infection, et en 2012, 6103 enfants vivaient avec le VIH, selon la Division de Lutte contre le SIDA et les IST. Durant cette même année, il y a eu 322 nouveaux cas d'infection dans cette population. Ces chiffres

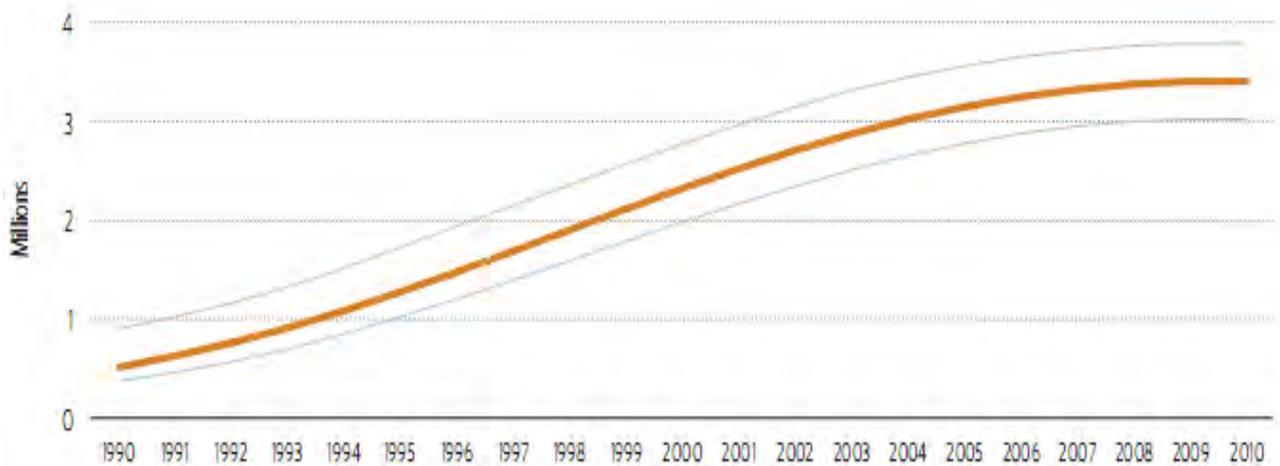
nous montrent que l'infection à VIH ne concerne pas uniquement les adultes, et constitue un réel problème de santé en pédiatrie.

## Chapitre 4 - VIH/SIDA en pédiatrie

L'infection à VIH pédiatrique constitue un réel problème de santé publique dans les pays à ressources limitées. Malgré les efforts consentis pour lutter contre la transmission verticale, il y a encore des enfants qui naissent infectés par le VIH. A cela, s'ajoute la complexité de la prise en charge de l'enfant infecté, surtout dans les pays à ressources limitées. Cela est lié à un certain nombre de contraintes telles que le retard du diagnostic néonatal, le manque de formulations pédiatriques des ARV, le défaut d'observance, l'émergence de la résistance. Le nombre d'enfants décédés de causes liées au SIDA est estimé à 250 000 en 2010, un nombre en diminution de 20% par rapport à 2005 (OMS, 2011). Cette tendance reflète l'expansion des services de PTME et l'amélioration de l'accès au traitement pour les enfants. Cependant, la prise en charge pédiatrique de l'infection à VIH reste confrontée à beaucoup d'obstacles, tels que le diagnostic précoce, le monitoring immunovirologique et l'émergence de la résistance aux antirétroviraux.

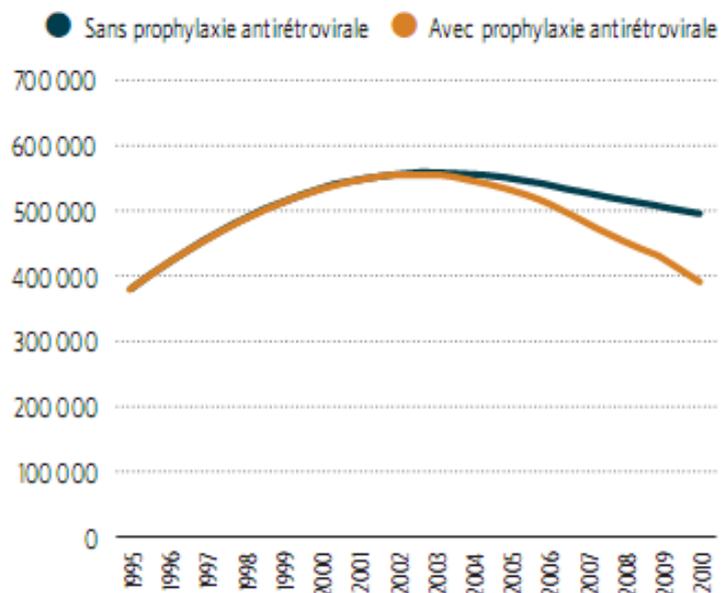
### 1-Epidémiologie

En 2010, parmi les 34 millions d'individus vivant avec le VIH dans le monde, 3,4 millions étaient des enfants (Figure 20).



**Figure 20: Nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH dans le monde (1990-2010)** (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

Il a été remarqué une diminution du nombre de décès de causes liées au SIDA chez les enfants, et cela est lié à une augmentation des services de PTME et à une amélioration de la prise en charge des enfants infectés. Le nombre de nouvelles infections a diminué de 1995 à 2010 (Figure 21), et en 2011 les nouvelles infections s'élevaient à 330 000 (ONUSIDA 2012). Une prophylaxie antirétrovirale fournie aux femmes enceintes vivant avec le VIH a permis la prévention de l'infection à VIH chez plus de 350 000 enfants depuis 1995.



**Figure 21: Nombre de nouvelles infections par le VIH chez l'enfant dans les pays à revenus faibles ou moyens, 1995-2010 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).**

### 1-1 Afrique Sub-saharienne

Des avancées remarquables ont été obtenues dans la réduction de l'incidence de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 15 ans en Afrique subsaharienne. Selon les estimations, 350 000 enfants ont été nouvellement infectés par le VIH dans cette région en 2010, contre 500 000 en 2001, soit une diminution de 30 %. Toujours selon les estimations, le nombre d'enfants décédés de causes liées au sida est passé de 320 000 en 2005 à 230 000 en 2010 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

## **1-2 Asie**

Globalement, le nombre d'enfants nouvellement infectés par le VIH a diminué de 23 % en Asie entre 2001 et 2010, passant de 28 000 à 22 000 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Cela s'explique probablement par une diminution du taux d'incidence de l'infection à VIH dans l'ensemble de cette région et par l'expansion, variable selon les endroits, des services de prévention de la transmission mère-enfant du VIH. Toutefois, on retrouve une tendance inverse en Asie de l'Est où l'incidence de l'infection à VIH chez l'enfant a augmenté de 31% au cours de cette même période, le nombre d'enfants nouvellement infectés étant passé de 1600 à 2200.

## **1-3 Europe orientale et Asie centrale**

Le nombre d'enfants nouvellement infectés par le VIH a augmenté d'environ un cinquième entre 2001 et 2010, passant de 1800 à 2200. Au cours de la même période, l'estimation du nombre total d'enfants vivant avec le VIH a été multipliée par cinq, passant de 3400 à 17 000, et le nombre d'enfants décédés de causes liées au sida a plus que doublé, passant de moins de 500 à près de 1200 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

## **1-4 Caraïbes**

La réduction de l'incidence de l'infection à VIH et l'élargissement de l'accès aux services permettant de prévenir la transmission mère-enfant de cette infection a conduit, entre 2001 et 2010, à une baisse de 60% du nombre d'enfants nouvellement infectés par le VIH (passant de 2900 à 1200), et à une diminution de 47% du nombre d'enfants décédés de causes liées au sida (passant de 1900 à 1000) (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Toutefois, les progrès ne sont pas uniformes dans toute la région. La couverture des programmes de prévention de la transmission mère-enfant est encore faible dans certains pays comme les Bahamas, le Belize et Haïti, mais relativement élevée à la Barbade, en République dominicaine et au Guyana.

## **1-5 Amériques latine**

Le nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH dans cette région a diminué, passant d'environ 47 000 en 2001 à 42 000 en 2010. Au cours de la même période, le nombre d'enfants nouvellement infectés a lui aussi considérablement diminué (de 6300 à 3900, soit une réduction de 38%) ; le nombre d'enfants décédés de causes liées au sida a suivi la même tendance (passant de 4400 à 2700, soit une réduction de 39%) (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

## **1-6 Amérique du Nord et Europe occidentale et centrale**

Si l'on considère l'ampleur globale de l'épidémie dans cette région, l'estimation du nombre d'enfants vivant avec le VIH est très faible: ils étaient un peu plus de 6000 en 2010. Ce chiffre traduit la fourniture à très grande échelle de services qui permettent de prévenir la transmission mère-enfant du VIH. En 2010, un nombre faible d'enfants de moins de 15 ans ont été nouvellement infectés par le VIH (moins de 500) ou sont décédés de maladies liées au sida (moins de 500) dans cette région (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

## **1-7 Moyen orient et Afrique du Nord**

Globalement, le nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH a presque doublé entre 2001 et 2010, passant de 24 000 à 40 000. Au cours de la même période, le nombre d'enfants nouvellement infectés est passé de 5400 à 6800, et le nombre d'enfants décédés de causes liées au sida est passé de 2600 à 3900 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Ces augmentations tiennent à l'accélération de l'épidémie, aux proportions relativement élevées de femmes parmi les personnes vivant avec le VIH (oscillant entre 44% et 45% entre 2001 et 2010) et à la fourniture trop souvent insuffisante de services de prévention de la transmission mère-enfant du VIH.

## **1-8 Océanie**

Globalement, environ 4600 enfants vivaient avec le VIH en Océanie en 2010, 500 d'entre eux ayant été nouvellement infectés cette année-là (Organisation Mondiale de la Santé, 2011).

L'infection de l'enfant par le VIH, survient généralement par voie verticale. Aujourd'hui grâce à l'utilisation des ARV, cette transmission peut être évitée.

## **2- Transmission du VIH de la mère à l'enfant et prévention**

La transmission mère-enfant représente la cause quasi exclusive de l'infection pédiatrique. Dans les pays à ressources limitées, la TME est la cause majeure de la mortalité infantile, car en l'absence de prophylaxie ARV, plus de 25% des enfants nés de mères séropositives deviennent infectés par le VIH (Mofenson L M, 2010 ; Bulterys M et Wilfert C M, 2009). Pour lutter contre cette transmission verticale du VIH, de nombreux programmes nationaux de prévention de la TME se sont mis en place. En 2011, 57% des femmes

concernées ont pu en bénéficier, avec de grandes disparités selon les pays et les régions (ONUSIDA 2012).

## **2-1 Moment de la transmission**

La transmission mère-enfant a lieu principalement en fin de grossesse (un tiers des cas) et autour de l'accouchement (deux tiers des cas) (Rouzioux C *et al.*, 1995). La transmission *in utero* a lieu surtout en fin de grossesse. La transmission au deuxième trimestre est possible, mais concerne des circonstances exceptionnelles, notamment l'accouchement prématuré (Brossard Y *et al.*, 1995). Cette transmission verticale peut aussi être tardif en survenant au moment de l'allaitement (Kourtis A P *et al.*, 2001 ; Kourtis A P *et al.*, 2006)

## **2-2 Mécanismes de la transmission**

La transmission verticale peut avoir lieu à travers les muqueuses du fœtus et du nouveau-né lors d'une exposition par voie ascendante ou lors de son passage dans la filière génitale. La présence de virus dans ce compartiment est variable selon les patientes ; elle est considérablement réduite sous traitement ARV. Par ailleurs on a pu détecter le VIH dans les aspirations gastriques de 30% des nouveau-nés malgré une prophylaxie par AZT et ce, quel que soit le mode d'accouchement (Mandelbrot I *et al.*, 1999). L'objectif du traitement préventif est de réduire la réplication virale maternelle pour diminuer la quantité de virus présente dans le sang maternel et les voies génitales au moment de l'accouchement et ainsi réduire le risque de transmission (Ioannidis J *et al.*, 2001).

La transmission peut survenir par voie placentaire. Elle peut concerner divers mécanismes : infection du trophoblaste (exceptionnelle), passage de cellules infectées ou de particules virales à travers la barrière trophoblastique, et surtout microtransfusions lors de l'accouchement (Menu E *et al.*, 1999).

L'allaitement est aussi une des voies de transmission verticale du VIH. Dans des études Africaines, le taux de transmission est doublé chez les enfants nourris au sein (Nduati R *et al.*, 2000). Le risque de transmission est important dans les premières semaines, mais il persiste pendant toute la durée de l'allaitement (Leroy V *et al.*, 1998). Ce risque est augmenté en cas de déficit immunitaire maternel ou de charge virale plasmatique maternelle élevée. La charge virale dans le lait joue un rôle important. Elle est corrélée à celle du plasma, mais peut être plus élevée notamment en cas de mastite. La transmission par l'allaitement peut être diminuée par un traitement antirétroviral chez la mère ou par une prophylaxie étendue chez le bébé.

## 2-3 Moyens de prévention de la transmission

Des stratégies efficaces ont permis d'agir à plusieurs niveaux :

- Réduire la charge virale maternelle plasmatique et génitale : ARV chez la mère
- Diminuer l'exposition en fin de grossesse et pendant le travail : ARV à l'accouchement, césarienne programmée
- Réaliser une prophylaxie après exposition : chez le fœtus par passage transplacentaire des ARV pris par la mère, chez le nouveau-né par administration directe
- Supprimer l'exposition postnatale : allaitement artificiel
- Préconiser l'allaitement maternel protégé : ARV chez la mère

### 2-3-1 Antirétroviraux

L'AZT en monothérapie a été la première stratégie préventive validée par des essais thérapeutiques, dans des pays industrialisés (France et Etats Unis) (Connor E M *et al.*, 1994) puis dans des pays en développement (Dabis F *et al.*, 2005). L'association AZT-3TC a ensuite été bien étudiée, notamment dans un essai clinique français où le taux de transmission était réduit à 1,6% (Mandelbrot L *et al.*, 2001). La névirapinemonodose chez la mère en travail et le nouveau-né a aussi montré une réduction du taux de transmission (Lallemant M *et al.*, 2004). En revanche, un essai thérapeutique international randomisé dans des pays industrialisés n'a pu mettre en évidence de réduction de taux de transmission avec la névirapine comparé à un placebo chez des mères recevant par ailleurs une prise en charge optimale et un traitement ARV : les taux de TME étaient de 1,5% dans les deux groupes (Dorenbaum A *et al.*, 2002).

Dans le but d'une meilleure PTME, l'efficacité de trithérapies antirétrovirales a été validée par les études observationnelles de cohortes. Une étude menée au Botswana portant sur un total de 730 femmes enceintes (Shapiro R L *et al.*, 2010) a comparé AZT-3TC+NVP, AZT-3TC+LPV/r et AZT-3TC+ABC : cette étude a pu montrer, en fonction des effectifs disponibles, l'équivalence des 3 combinaisons antirétrovirales, avec un taux global de transmission de 1,1% à six mois.

En 2006, l'OMS recommandait de commencer la prophylaxie par ARV au cours du troisième trimestre de grossesse (28<sup>ème</sup> semaine). Le schéma de base recommandé comprenait de l'AZT et une dose unique de NVP au moment du travail et de l'accouchement, ainsi qu'une prophylaxie pour le nourrisson pendant une semaine après la naissance. Ces recommandations ont été revues en 2010, et deux options ont été par la suite proposées. Ces nouvelles stratégies devraient être commencées chacune de façon plus précoce pendant la

grossesse, à 14 semaines ou dès que possible par la suite. La première option est basée sur une administration quotidienne d’AZT à la mère et au nourrisson pendant 6 semaines après la naissance. Cette prophylaxie pour le nourrisson devra être continuée jusqu’à la fin de l’allaitement maternel. La deuxième option met en jeu un schéma de trois médicaments pour la mère à prendre pendant la grossesse et pendant toute la durée de l’allaitement, ainsi qu’une prophylaxie pour l’enfant pendant 6 semaines après la naissance (Organisation Mondiale de la Santé, 2010b). Une troisième proposition vient d’être effectuée, il s’agit de l’option B+ (Tableau I).

En Mars 2010, le Sénégal avait adopté l’option B des recommandations de l’OMS. Ces directives nationales ont été révisées, et depuis Août 2012, c’est l’option B+ qui est en vigueur au niveau du pays (Division de Lutte Contre le SIDA et les IST, 2012b).

**Tableau I : Différentes options pour le programme PTME (OMS, 2012)**

	La femme reçoit		L'enfant reçoit
	Un traitement (si le nombre de CD4 est $\leq 350$ cellules/mm <sup>3</sup> )	Une prophylaxie (si le nombre de CD4 est $> 350$ cellules/mm <sup>3</sup> )	
<b>Option A</b>	Trois ARV commencés sitôt le diagnostic posé, poursuivis toute la vie	<p>Avant l'accouchement: AZT dès la 14<sup>ème</sup> semaine de grossesse</p> <p>Pendant l'accouchement: au début du travail, NVP en dose unique et première dose d'AZT/3TC</p> <p>Post-partum: AZT/3TC tous les jours pendant 7 jours post-partum</p>	NVP tous les jours depuis la naissance jusqu'à 1 semaine après l'arrêt de tout allaitement au sein ; en l'absence d'allaitement au sein ou si la mère est sous traitement, jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines
<b>Option B</b>	Trois ARV commencés sitôt le diagnostic posé, poursuivis toute la vie	Trois ARV commencés dès la 14 <sup>ème</sup> semaine de grossesse et continués pendant l'accouchement jusqu'à la naissance de l'enfant en l'absence d'allaitement au sein ou jusqu'à 1 semaine après l'arrêt de tout allaitement au sein	NVP ou AZT tous les jours depuis la naissance jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines quelle que soit la méthode d'alimentation du nourrisson
<b>Option B+</b>	Quel que soit le nombre de CD4, trois ARV commencés sitôt le diagnostic posé, poursuivis toute la vie	<b>ARV identiques pour le traitement et la prophylaxie:</b>	NVP ou AZT tous les jours depuis la naissance jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines quelle que soit la méthode d'alimentation du nourrisson

### **2-3-2 Césarienne programmée**

L'effet protecteur d'une césarienne à membranes intactes et avant le début du travail est désormais établi par plusieurs études de cohortes, portant au total sur plus de 8500 couples mère-enfant (International Perinatal HIV Group, 1999), et par un essai thérapeutique randomisé européen (European mode of delivery collaboration, 1999). De même en 2008, dans la cohorte britannique et irlandaise, chez des femmes n'ayant pas d'indication à un traitement pour elles mêmes, il n'y a aucun cas de transmission avec l'AZT en monothérapie et une césarienne programmée (Townsend C L, 2008). En revanche, le taux de transmission n'est pas diminué en cas de césarienne en cours de travail ou à membranes rompues (Mandelbrot L *et al.*, 1998).

### **2-3-3 Prévention lors de l'allaitement**

L'allaitement artificiel est le seul moyen d'éviter le risque de transmission postnatale. Il est sans danger dans les pays industrialisés et sa prescription est bien suivie par les mères séropositives.

Au moment des lignes directrices de l'OMS en 2006, il n'y avait pas assez de données pour étayer l'utilisation d'ARV pour prévenir la transmission du VIH de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel. Depuis lors, plusieurs essais cliniques ont montré l'efficacité et l'acceptabilité d'une prophylaxie donnée à la mère ou au nourrisson pendant l'allaitement maternel (OMS, 2012). L'enjeu est crucial dans les pays en voie de développement où l'allaitement artificiel pose des problèmes économiques et sociaux difficiles et entraîne une augmentation de la mortalité infantile. Deux approches sont actuellement validées, d'une part la poursuite du traitement ARV chez la mère, les ARV protégeant de la transmission par l'allaitement maternel, et d'autre part la poursuite de la prophylaxie chez l'enfant pendant la période d'allaitement. Ces deux stratégies sont comparables en efficacité (Chasela C S *et al.*, 2010).

En dépit des moyens de préventions contre la TME du VIH, des enfants naissent encore infectés par ce virus. Chez ces patients pédiatriques, la physiopathologie de cette infection ressemble à celle observée dans le cas de l'adulte. La principale différence est l'existence de deux formes évolutives chez les enfants.

### **3- Physiopathologie de l'infection**

Dans son ensemble, l'infection à VIH de l'enfant n'est guère différente de celle de l'adulte. Le déficit immunitaire sévère aboutit aux mêmes complications infectieuses. Toutes les pathologies viscérales liées à une atteinte directe du virus ou à un mécanisme immunopathologique indirect (encéphalopathie, cardiopathie, néphropathie, etc.) ont été décrites chez l'enfant. La pathologie tumorale est aussi décrite, y compris le sarcome de Kaposi, qui reste toutefois exceptionnel, du moins dans les pays du Nord. La différence principale réside en fait dans l'existence de deux profils évolutifs différents, dont l'un est associé à une encéphalopathie sévère (Chakraborty R, 2005).

#### **3-1 Cellules cibles du VIH**

Les cellules sensibles à l'infection à VIH sont impliquées dans l'entrée et dans la dissémination des virus dans l'organisme. Les différentes sous-populations cellulaires infectées sont les lymphocytes T CD4+ helper (ou auxiliaire), en particulier les cellules T CD4+ mémoires, des cellules présentatrices d'antigène (macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langherans) et les cellules microgliales du cerveau. Les cellules présentatrices d'antigènes et surtout des sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires jouent un rôle important de réservoirs viraux. Il a été également démontré qu'une molécule de surface (DC-SIGN) exprimée sur les cellules dendritiques est capable de lier le VIH et de le transmettre aux lymphocytes T CD4+ (Lekkerkerker A N *et al.*, 2006).

#### **3-2 Organes lymphoïdes: cibles précoces du VIH**

Lorsque le virus pénètre dans l'organisme, il infecte les cellules cibles muqueuses présentes (Haase A T, 2010). Ces dernières répliquant le VIH vont migrer jusqu'aux organes lymphoïdes qui, par la suite, vont constituer un réservoir important de virus (Pantaleo G *et al.*, 1993). Les virions séquestrés et transportés par les cellules dendritiques seraient présentés et transmis par contacts cellulaires aux cellules lymphoïdes ganglionnaires. Cette atteinte et cette dissémination du virus au sein du ganglion résultent très probablement d'une activation généralisée et chronique des cellules immunes. Cette dernière se traduit par une infiltration de lymphocytes CD8+ dans les centres germinatifs et par une accumulation de lymphocytes B, qui est à l'origine de l'hyperplasie folliculaire observée lors de la phase asymptomatique de l'infection. C'est donc en réponse à cette activation chronique que les centres germinatifs et les zones T des ganglions seraient progressivement détruits lors de l'évolution symptomatique de l'infection.

Les ganglions ne sont pas les seuls organes lymphoïdes atteints par le VIH. D'autres tissus tels que la rate, le thymus, et surtout l'intestin sont touchés. En effet, des études ont révélé une infection massive associée à une déplétion profonde de cellules T CD4+ mémoires au niveau de la *lamina propria* dès les premiers jours de la phase aiguë de l'infection VIH-1 (Brenchey J M *et al.*, 2006). Ainsi, les processus pathologiques de l'infection VIH-1 seraient initiés dans les organes lymphoïdes dès le début de l'infection, et le déficit qualitatif et quantitatif des lymphocytes CD4+ circulants ne serait que le reflet tardif d'événements tissulaires extrêmement précoces, liés à l'infection elle-même et à l'activation immune en réponse à cette infection au niveau de ces tissus. Chez les adultes les réponses cellulaires spécifiques permettent un rapide déclin de la charge virale durant les premières semaines de l'infection (Walker 1991, Koup 1994, Bollinger 1996, Hess 2004). Ce cas de figure est souvent absent chez les enfants à cause d'une réponse cellulaire sous optimale, (Goulder 2001, Hansasuta et Rowland-Jones 2001).

### **3-3 Conséquences de la réplication du VIH *in vivo***

De multiples facteurs semblent jouer un rôle dans l'évolution de l'infection induite par le VIH. L'état de chronicité observé est lié à l'infection rapide de tissus lymphoïdes, à l'établissement précoce de réservoirs viraux (cellules présentatrices d'antigènes mais aussi lymphocytes CD4+ au repos) (Siliciano J D et Siliciano R F, 2004) et à la réplication constante du virus *in vivo*. Cette réplication constante conduit à l'émergence et/ou à la sélection de variantes virales qui échappent aux réponses immunes de l'hôte (McMichael A J, 2006). La réplication constante du virus *in vivo* se traduit par un renouvellement rapide et permanent de nouveaux virions circulants (environ  $10^9$  virions par jour), dont résulterait l'accroissement régulier de la charge virale tissulaire et circulante observée au cours de l'évolution de l'infection (Ho D D *et al.*, 1995). Cette charge virale croissante est considérée comme responsable de la disparition progressive des lymphocytes T CD4+ par des mécanismes directs (effet cytopathogène du VIH pour les cellules CD4+, par exemple) et indirects (perturbation de l'homéostasie et activation chronique des cellules immunocompétentes) (Douek D C *et al.*, 2003).

Ainsi, grâce à un système de régulation complexe de son cycle viral et de sa dissémination chez l'hôte, le VIH possède une remarquable capacité à se répliquer et à échapper aux contrôles de l'hôte *in vivo*, y compris durant les phases dites silencieuses de l'infection (Brenchey J M *et al.*, 2006; Siliciano J D et Siliciano R F, 2004; McMichael A J, 2006; Ho D D *et al.*, 1995, Douek D C *et al.*, 2003). Toute stratégie d'intervention

thérapeutique doit prendre en considération l'importance des événements très précoces de l'infection à VIH *in vivo*, en particulier l'établissement et la persistance des réservoirs viraux, mais aussi l'induction très rapide, par le virus et ses constituants, d'anomalies d'activation de la réponse immune de l'hôte, y compris de l'immunité innée (Fauci A S *et al.*, 2005).

La destruction du système immunitaire et la progression clinique avec apparition de maladies opportunistes sont directement liées au taux sanguin des lymphocytes T CD4+ du patient (Ho D D *et al.*, 1995). Une fois le diagnostic positif établi, un suivi régulier de l'infection doit être effectué, pour assurer une bonne prise en charge de la maladie et ainsi évaluer au mieux l'état du malade. L'efficacité des traitements antirétroviraux est évaluée par le niveau de réplication virale mesurée par la charge virale VIH (taux d'ARN plasmatique), la mesure du nombre de lymphocytes T CD4+ (immunocompétence ou immunodépression) et par l'état clinique du patient.

## **4- Aspects cliniques de la maladie**

### **4-1 Forme rapidement évolutive**

Elle concerne environ 15% (Mayaux M J *et al.*, 1996) des enfants infectés et se caractérise par la constitution, en quelques mois, d'un déficit immunitaire sévère qui touche, en général, aussi bien l'immunité cellulaire que l'immunité humorale. Les premiers symptômes, notés entre 1 et 3 mois, sont une hépatosplénomégalie ou des adénopathies, notamment axillaires. Les complications infectieuses sévères de type opportunistes sont précoces, voire inaugurales (mycoses oesophagienne ou pneumocytose pulmonaire, le plus souvent). La complication spécifique de cette situation est l'encéphalopathie (Chakraborty R, 2005). En l'absence de traitement antirétroviral, les signes neurologiques s'aggravent progressivement et le décès survient en général avant l'âge de 4 ou 5 ans. L'identification des enfants à risque de développer cette forme évolutive est difficile dans les premiers mois de vie avant l'apparition des symptômes sévères. Le degré de réplication virale initiale est certes plus élevé en moyenne pour ce groupe d'enfants mais des valeurs très élevées peuvent aussi être observées chez des enfants non concernés. La chute des CD4 peut être très brutale, en quelques semaines. La détection dès la naissance du virus (signe d'une contamination *in utero*) est associée statistiquement à un risque plus élevé de forme précoce et sévère (Mayaux M J *et al.*, 1996). Cela a été également le cas de la co-infection par le CMV et le degré d'avancement de la maladie maternelle.

## **4-2 Forme lente évolutive**

Chez 85% des enfants infectés, les perturbations immunitaires significatives n'apparaissent qu'après plusieurs années d'évolution (Blanche S *et al.*, 1997), parfois même après l'âge de 10 ou 15 ans. La symptomatologie clinique peut débuter assez précocement, avant l'âge de 6 mois, sous forme d'une polyadénopathie, avec ou sans hépatosplénomégalie, mais ces symptômes restent stables ou même disparaissent pour faire place à une longue période asymptomatique. Les complications infectieuses suivent la lente dégradation du statut immunitaire. Des infections bactériennes, orto-rhino-laryngologiques ou bronchiques, sont observées dans un premier temps puis, lorsque le taux de lymphocytes T CD4 est effondré, surviennent des infections opportunistes identiques à celles de l'adulte (Blanche S, 1998). De plus, c'est souvent dans cette forme évolutive que sont observées les atteintes viscérales non infectieuses telles que pneumopathie interstitielle lymphoïde, néphropathie ou cardiopathie, ainsi que la pathologie tumorale lymphomateuse. L'atteinte neurologique ne prend jamais ici la forme de l'encéphalopathie du nourrisson mais correspond plutôt à ce qu'est observé chez l'adulte en situation de déficit immunitaire sévère, avec troubles cognitifs, syndrome psychiatrique, syndrome pseudoparkinsonien. La progression en termes de mortalité et de morbidité est similaire à long terme à celle des adultes infectés par le VIH.

## **4-3 La classification de l'OMS**

Selon les manifestations cliniques au cours de l'infection à VIH chez l'enfant, l'OMS a défini des stades (Tableau II). Cette classification clinique des enfants qui ont une infection par le VIH confirmée ou fortement suspectée, permet d'évaluer la sévérité de la maladie, d'évaluer sa progression, d'identifier les options thérapeutiques et de déterminer à quel moment débiter le traitement ARV.

**Tableau II : Classification pédiatrique de l'OMS du VIH/SIDA**

([http://www.cosego.net/assets/ressources/epu\\_files/classification\\_sida%20\\_OMS.pdf](http://www.cosego.net/assets/ressources/epu_files/classification_sida%20_OMS.pdf)) (site consulté en avril 2013)

Stade clinique	Manifestations
<b>Stade clinique 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Asymptomatique</li> <li>- Lymphadénopathie généralisée persistante</li> </ul>
<b>Stade clinique 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hépatosplénomégalie persistante inexpliquée</li> <li>- Infection à VPH étendue, faciale de plus de 5% de la surface corporelle ou entraînant une défiguration</li> <li>- Éruptions de papules prurigineuses</li> <li>- Mycoses des ongles</li> <li>- Érythème gingival linéaire</li> <li>- VPH ou molluscum contagiosum étendus (&gt; 5 % de la surface corporelle/faciale)</li> <li>- Ulcérations buccales récurrentes (&gt; 2 épisodes/6 mois)</li> <li>- Parotidomégalie persistante inexpliquée</li> <li>- Herpès zoster</li> <li>- Infection récurrente ou chronique des voies respiratoires supérieures : Otite moyenne, otorrhée, sinusite, tonsillite (&gt; 2 épisodes/6mois)</li> </ul>
<b>Stade clinique 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Malnutrition modérée inexpliquée ne répondant pas à une thérapie standard</li> <li>- Diarrhée persistante inexpliquée (≥ 14 jours)</li> <li>- Fièvre persistante inexpliquée (intermittente ou constante &gt; 1 mois)</li> <li>- Candidose buccale persistante (en dehors des 6-8 premières semaines de vie)</li> <li>- Leucoplasie orale chevelue</li> <li>- Adénopathie tuberculeuse</li> <li>- Tuberculose pulmonaire</li> <li>- Pneumonie sévère ou récurrente, présumée bactérienne (épisode en cours plus au moins un autre épisode dans les six mois précédents)</li> <li>- Gingivite ulcéro-nécrotique/parodontite aiguë</li> <li>- Pneumopathie lymphoïde interstitielle</li> <li>- Maladie pulmonaire chronique associée au VIH, dont bronchectasie</li> <li>- Épisodes inexpliqués d'anémie (&lt; 8 gm/dL), de neutropénie (&lt; 1 000/mm<sup>3</sup>) ou de thrombocytopénie (&lt; 50 000/mm<sup>3</sup>) pendant &gt; 1 mois.</li> <li>- Myocardiopathie liée au VIH</li> <li>- Néphropathie liée au VIH</li> </ul>
<b>Stade clinique 4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amaigrissement sévère ou malnutrition sévère inexpliqués ne répondant pas à une thérapie standard</li> <li>- Pneumonie à pneumocystis</li> <li>- Infections bactériennes sévères récurrentes présumées</li> <li>- Infection à HSV chronique bucco-labiale, cutanée ou viscérale (durée &gt;1 mois)</li> <li>- Tuberculose extrapulmonaire</li> <li>- Sarcome de Kaposi</li> <li>- Candidose oesophagienne (ou candidose de la trachée, des bronches ou des poumons)</li> <li>- Toxoplasmose cérébrale (en dehors de la période néonatale)</li> <li>- Cryptococcose extrapulmonaire dont méningite</li> <li>- Toute mycose endémique généralisée (histoplasmosse extrapulmonaire, coccidiomycose, penicilliose)</li> <li>- Cryptosporidiose ou isosporose (avec diarrhée &gt; 1 mois)</li> <li>- Infection à CMV de la rétine ou d'un autre organe et apparition à &gt; 1 mois d'âge</li> <li>- Maladie mycobactérienne généralisée autre que la tuberculose</li> <li>- Fistule vésico-rectale acquise associée au VIH</li> <li>- Lymphome cérébral ou lymphome B non Hodgkinien</li> <li>- Leucoencéphalopathie multifocale progressive</li> <li>- Encéphalopathie à VIH</li> </ul>

En pédiatrie la prise en charge thérapeutique précoce est d'une importance capitale car elle permet de sauver des vies. Cette prise en charge précoce n'est possible que quand le diagnostic néonatal est effectué à temps, c'est-à-dire dans les premières semaines de vie.

## **5- Diagnostic**

Les tests biologiques de détection du VIH sont de 2 types : tests indirects, ou sérologiques, visant à détecter dans le sang les anticorps produits par le système immunitaire contre les antigènes du virus; tests directs, reposant sur la mise en évidence du virus (détection d'un composant du virus, comme l'antigène p24, ou de son génome par PCR) (Constantine N T *et al.*, 2005).

Le choix des tests dépend de l'âge du sujet testé : chez l'enfant de plus de 18 mois et l'adulte, le dépistage de l'infection à VIH se fait essentiellement à l'aide des tests sérologiques; chez l'enfant de moins de 18 mois, il fait obligatoirement appel aux tests de détection directe du virus. À cet âge, les tests sérologiques ne sont pas utilisables car l'enfant né d'une mère infectée par le VIH a dans son sang des anticorps anti-VIH d'origine maternelle qu'il n'est pas possible de distinguer de ceux qu'il aurait éventuellement produits lui-même.

### **5- 1 Diagnostic clinique**

Les enfants diffèrent des adultes en ce sens qu'ils ont un niveau élevé de réplication virale, des charges virales très élevées, des taux élevés de destruction des lymphocytes T CD4 +, des taux de résistance élevés, une progression plus rapide de la maladie (Behrman R *et al.*, 2007). Les symptômes cliniques sont très variables au sein de la population pédiatrique. La plupart sont asymptomatiques à la naissance et n'ont pas d'anomalies visibles (Sagar A et Vasudevan B, 2012 ; Abuzaitoun O R et Hanson I C, 2000).

Dans un contexte où les tests virologiques ne sont pas disponibles, un diagnostic présomptif doit être effectué. Les critères cliniques de l'OMS pour un diagnostic de présomption d'une infection par le VIH chez les enfants de moins de 18 mois sont donnés dans le tableau III.

**Tableau III : Critères de réalisation d'un diagnostic présomptif d'une infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois lorsque les tests virologiques ne sont pas disponibles**  
(Organisation Mondiale de la Santé, 2010a)

Un diagnostic présomptif d'une infection à VIH doit être effectué si :

- L'enfant a des anticorps anti VIH ; et
- Le diagnostic de tout autre indicateur de l'infection effectué

Ou

- L'enfant est symptomatique avec deux ou plusieurs des indicateurs suivants
  - Muguet
  - Pneumonie sévère
  - Infection sévère

Autres facteurs indicateurs d'une infection à VIH chez un enfant séropositif

- Décès récent de la mère lié au VIH ; ou stade avancé de l'infection à VIH maternelle
- Taux de lymphocytes T CD4+ < 20%

Une confirmation de l'infection doit être envisagée aussi tôt que possible

## **5-2 Diagnostic biologique**

Le diagnostic de l'infection à VIH chez l'enfant nécessite un système intégré des services cliniques et biologiques pour un bon monitoring et de meilleurs résultats. Il est important d'identifier une exposition au VIH, d'établir un diagnostic définitif et d'initier une thérapie ARV le plus tôt possible chez les enfants de moins de 2 ans, car le décès peut survenir rapidement (Behrman R *et al.*, 2007). Comme précédemment souligné, ce diagnostic repose sur la mise en évidence directe de la présence du virus, dès les premières semaines de vie de l'enfant né de mère séropositive. Dans le cas de l'enfant sous allaitement maternel, il est nécessaire de refaire l'analyse au moins 6 semaines après le sevrage pour confirmer un diagnostic négatif de l'infection à VIH. Après 18 mois d'âge, un test de screening (spot/ELISA) peut être effectué pour confirmer le statut sérologique de l'enfant.

### 5-2-1 Diagnostic moléculaire

Il est effectué grâce à des techniques permettant de détecter le matériel génétique viral. La recherche de l'ADN dans les cellules blanches et de l'ARN (Cunningham C K., 1999) dans le plasma sont les méthodes moléculaires utilisées pour réaliser le diagnostic de l'infection à VIH chez l'enfant de moins de 18 mois (Delamare C *et al.*, 1997 ; Young N L *et al.*, 2000). Cette mise en évidence du génome viral est non seulement utilisée pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH mais aussi pour clarifier une sérologie douteuse.

La recherche de l'ADN est la technique de référence dans le diagnostic néonatal de l'infection à VIH. Plusieurs travaux ont montré que la sensibilité de la PCR ADN est inférieure à 40% durant les 48 premières heures de vie, et dépasse 90% à 4 semaines de vie (Bremer J W *et al.*, 1996 ; Dunn D T *et al.*, 1995). Il existe des plateformes de diagnostic néonatal basées sur la recherche de l'ADN proviral. C'est l'exemple de la plateforme Amplicor des laboratoires Roche (Piwowar-Manning E *et al.*, 2008), qui est un test basé sur l'amplification d'une séquence cible de l'ADN par la PCR, et une hybridation de l'acide nucléique pour la détection de l'ADN proviral du VIH-1 dans le sang total. Les deux types de prélèvements (buffycoat et DBS) peuvent être utilisés sur cette plateforme. L'Amplicor comprend 4 grandes étapes: la préparation de l'échantillon, l'amplification par PCR d'une séquence cible de l'ADN grâce à des amorces complémentaires, l'hybridation du produit amplifié à des sondes spécifiques, et la détection par colorimétrie.

L'ADN viral n'est pas le seul type d'acide nucléique pouvant être détecté chez l'enfant infecté. L'ARN du VIH peut être mis en évidence quantitativement au moyen de la PCR en temps réel; le principe en est le «comptage» du nombre de copies du virus (charge virale). Vue la disponibilité de ces techniques ARN et leur automatisation il était important de mener des investigations sur leur utilisation pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH. Des études ont alors montré que ces techniques ARN sont aussi sensibles que les techniques ADN pour le diagnostic néonatal (Rouet F *et al.*, 2001 ; Cunningham C K *et al.*, 1999; Burgard M *et al.*, 2012), et d'autres ont même montré que chez les nouveaux nés âgés de moins de 2 mois, cette recherche de l'ARN viral a une meilleure sensibilité (Cunningham C K *et al.*, 1999, Lambert J S *et al.*, 2003). En plus du diagnostic, ces techniques ARN donnent une idée sur la charge virale du patient. C'est le cas de l'appareil NucliSENS des laboratoires Biomérieux, qui est une technique qui a pour cible une région du gène *gag* et permet l'amplification du VIH-1 et certains sous-types du VIH-2 dans un intervalle de 25 à 1 000 000 de copies/ml de plasma (Rodes B *et al.*, 2007). Comme avec l'Amplicor, les deux types de

prélèvements peuvent aussi être utilisés sur cette plateforme. L'extraction de l'ARN est effectuée par le NucliSENSminiMag, et est basée sur la technologie de Boom utilisant de la silice magnétique. L'amplification basée sur la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), utilise des amorces spécifiques de l'ARN de type sauvage et l'ARN du calibrateur. Ainsi tout ARN du VIH de type sauvage présent dans l'extrait est co-amplifié avec le calibrateur interne. La réaction de détection utilise des balises moléculaires spécifiques à la cible.

En pratique, le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez l'enfant né de mère séropositive dans les pays en développement, nécessite un laboratoire équipé disposant d'une équipe formée pour la réalisation de tests de biologie moléculaire, qu'il s'agisse de la PCR ADN ou de la RT-PCR ARN du VIH, effectués à partir de prélèvements sanguins réalisés sur tubes ou sur papier buvard. Aujourd'hui, l'OMS recommande de faire un test virologique entre 4 et 6 semaines de vie (Organisation Mondiale de la Santé, 2010b). Alors, le choix de la technique de biologie moléculaire (RT-PCR ARN ou PCR ADN du VIH) doit être discuté en fonction des conditions de prélèvements, des conditions techniques de transport et de conservation des échantillons, et des conditions opératoires, variables selon les trousseaux utilisés.

Il faut souligner que la meilleure technique peut devenir médiocre, si elle est utilisée dans de mauvaises conditions. Ainsi, chaque laboratoire, site et pays, est associé à des conditions opérationnelles, économiques et politiques différentes, ce qui justifie l'élaboration de solutions toujours particulières pour lesquelles l'encadrement, la formation et le suivi des équipes techniques, conditionnent tout le succès de la mise en place du diagnostic précoce de l'infection à VIH chez l'enfant né de mère infectée.

Au Sénégal, le Ministère de la Santé et de la Prévention a défini des directives nationales pour ce diagnostic néonatal du VIH. Ainsi il est recommandé de faire une première PCR, 6 semaines après la naissance de l'enfant exposé au VIH. Si le résultat est positif alors un prélèvement est effectué pour une deuxième PCR, et l'enfant est mis sous ARV. Si par contre le résultat est négatif, une sérologie sera effectuée à 14 mois de vie, c'est-à-dire 2 mois après arrêt de l'allaitement. Au cas où la deuxième PCR est positive, alors le traitement est poursuivi. Mais lorsqu'elle est négative, dans ce cas une troisième PCR effectuée. Si celle-ci est positive, alors l'enfant est considéré comme étant infecté par le VIH. Si elle est négative, l'enfant n'est dans ce cas pas infecté par le VIH (Ministère de la Santé, 2010).

### **5-2-2 La culture virale**

L'isolement du virus à partir du sang de sujets infectés est une approche longue, coûteuse et nécessitant un laboratoire de confinement de haute sécurité. L'isolement est réalisé directement à partir de cellules mononucléées du sang, par mise en culture des échantillons en présence de cellules mononucléées du sang d'un donneur sain, qui servent de support pour la multiplication virale (Hollinger F B *et al.*, 1992 ; Hammer S *et al.*, 1993). Cette multiplication virale est mise en évidence par dosage dans le milieu de culture de l'antigène p24. Actuellement, cette approche peut être intéressante dans le cas de variantes ou de recombinants non reconnus par les techniques de biologie moléculaire visant à détecter l'ARN viral ou l'ADN proviral.

### **5-2-3 Intérêt du papier buvard**

Les sites de PTME ne sont pas toujours proches du laboratoire pouvant faire les tests virologiques pour poser le diagnostic de l'infection à VIH chez le nouveau né. Il se trouve alors contraignant de transporter des prélèvements qui doivent être reçus dans les délais tout en respectant la chaîne de froid. Cette contrainte majeure a pu être résolue grâce à l'utilisation du papier buvard. Les prélèvements sur papier buvard (ou papier filtre) sont particulièrement intéressants aux yeux des équipes cliniques, car ils permettent de recueillir facilement des gouttes de sang par piqûre au talon ou au doigt des nourrissons, à la maternité ou dans des régions décentralisées. Ils permettent de conserver les échantillons de sang séchés à température ambiante (ou congelés), dans des sacs étanches en prévenant l'humidité. Ils ont aussi l'avantage d'être faciles à acheminer vers les laboratoires. Ce procédé de prélèvement de sang facilite la décentralisation. Par ailleurs, la technique du recueil de sang sur papier buvard évite le déplacement d'équipes spécialisées, car le prélèvement peut être réalisé par toute personne correctement formée. Cette technique a montré ses preuves dans les enquêtes séro-épidémiologiques et dans les tests moléculaires qualitatifs et même quantitatifs (Bertagnolio S *et al.*, 2010).

Le diagnostic de l'infection à VIH est une étape cruciale dans le suivi du patient. C'est à la connaissance de l'état d'infection du patient qu'il peut être pris en charge et mis sous traitement ARV en cas de besoin.

## **6- Prise en charge thérapeutique de l'infection**

Après la disponibilité du TARV et le passage à l'échelle, l'infection par le VIH qui jadis était considérée comme une maladie mortelle, est devenue une maladie chronique traitable. Cependant, en pédiatrie il y a des barrières à une bonne prise en charge des enfants infectés par le VIH, telles que le retard dans le diagnostic, le manque de formulations d'ARV pédiatriques appropriées et le manque d'un personnel de santé bien formé sur la prise en charge pédiatrique.

Tous les enfants ayant un test virologique positif doivent être mis sous traitement et il est bien documenté que le fait de débiter le TARV de façon précoce peut réduire la morbidité et la mortalité (Violari A *et al.*, 2008). Une fois que l'enfant est mis sous ARV, une évaluation de l'adhérence, de la réponse au traitement, d'une toxicité des médicaments, ou d'un échec thérapeutique, est réalisée au cours du suivi. Une évaluation clinique et biologique devra être effectuée avant de débiter tout traitement ARV.

Le traitement standard comprend trois ARV, dans le but d'obtenir une suppression de la réplication virale, une augmentation du taux de lymphocytes T CD4+ et une amélioration de l'état clinique.

### **6-1 Le traitement antirétroviral**

Les antirétroviraux constituent aujourd'hui l'arsenal thérapeutique contre le VIH, qui s'étoffe progressivement. Plus d'une vingtaine de molécules sont disponibles, interférant à différents niveaux du cycle répliatif du VIH. Le premier traitement anti-VIH disponible fut la monothérapie à base d'AZT en 1985, montrant une efficacité sur l'activité de la TI *in vitro* (Mitsuya H *et al.* 1987). Bien qu'elle présente de nombreux effets secondaires tels que l'anémie, le premier essai clinique démontra que la prise d'AZT augmentait le nombre de CD4 chez les malades du SIDA. Cette monothérapie a vite évolué en concept de trithérapie, incluant de nouvelles molécules antirétrovirales telles que les inhibiteurs de protéase, montrant une réduction significative de la mortalité liée au SIDA.

Ce traitement ARV mis en route a pour objectif principal d'empêcher la progression vers le SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes T CD4+. Pour atteindre cet objectif, le traitement doit empêcher la réplication du virus afin de rendre la charge virale plasmatique indétectable, permettant ainsi une meilleure restauration du système immunitaire.

## **6-2 Les molécules antirétrovirales : classes existantes**

La thérapie antirétrovirale cible de façon spécifique les différentes étapes du cycle de réplication à savoir l'attachement du virus à la surface des cellules (les antagonistes des corécepteurs), la fusion entre les membranes virales et cellulaires (les inhibiteurs de fusion), la rétrotranscription de l'ARN en ADNc (les inhibiteurs de la transcriptase inverse), l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire (les inhibiteurs de l'intégrase) et la maturation des particules virales (les inhibiteurs de la protéase) (figure 22). A ce jour, ce sont 2 inhibiteurs d'entrée, 1 inhibiteur d'intégrase, 5 INNTI, 7 INTI, 10 inhibiteurs de protéase qui ont été approuvés par le FDA (Tableau IV) (US Food and Drug Administration. (<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>)). Cependant, ces molécules antirétrovirales ne sont pas toutes utilisées en pédiatrie. Les classes d'ARV existantes sont utilisées chez les enfants à l'exception de l'inhibiteur du corécepteur (le Maraviroc). Le traitement ARV fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, et de nombreux essais cliniques sont en cours, afin de mettre au point des molécules plus efficaces (Hartman T L et Buckheit R W Jr, 2012).

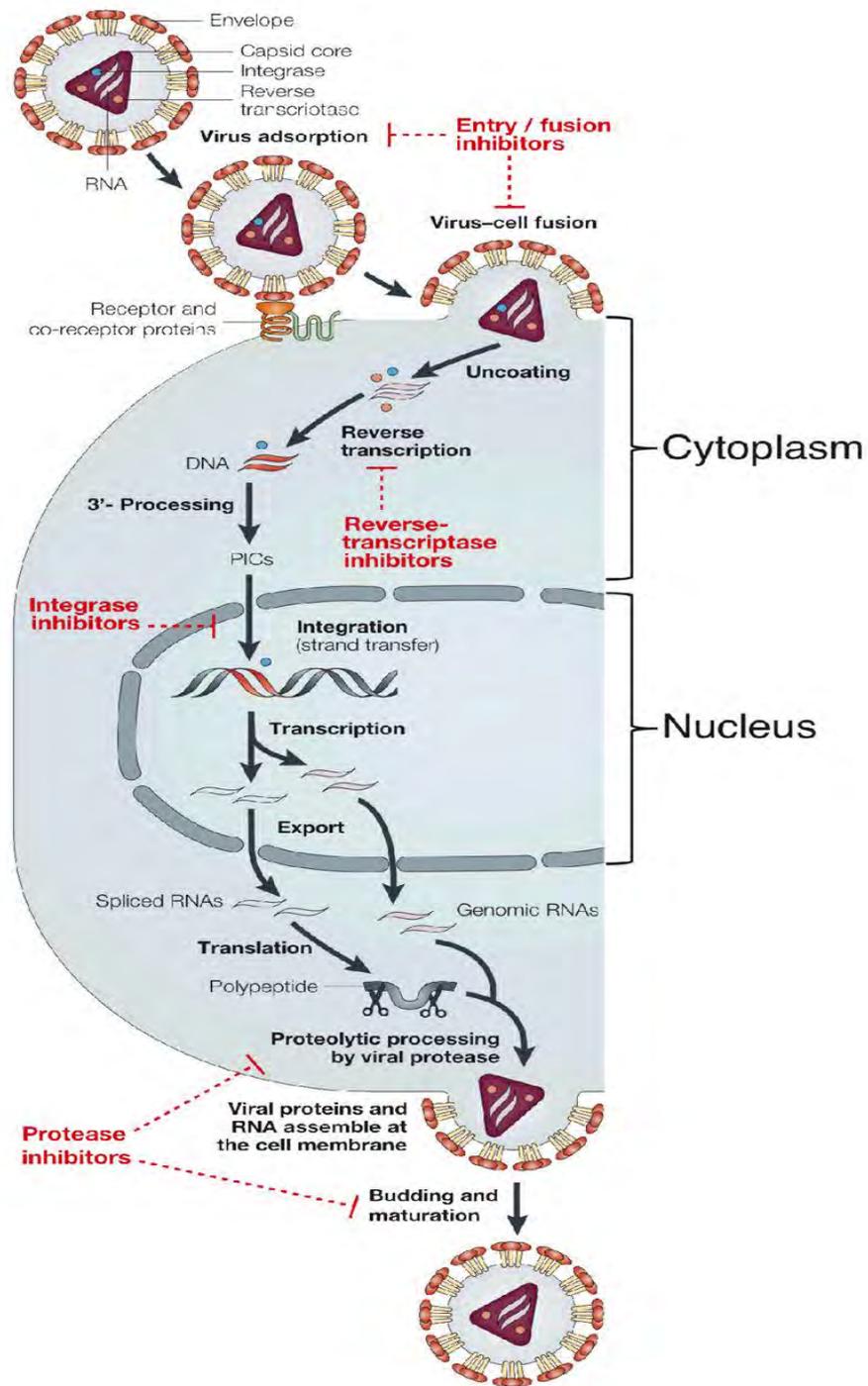


Figure 22: Molécules antirétrovirales et cibles (Metifiot M *et al.*, 2010)

**Tableau IV: Liste des ARV commercialisés en 2012 (US Food And Drug Administration, 2011)**

Dénomination commune internationale (DCI)	Abréviation	Nom de spécialité
<b>Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidique de la transcriptase inverse</b>		
Zidovudine	AZT	Rétrovir®
Didanosine	ddI	Videx®
Stavudine	d4T	Zérit®
Lamivudine	3TC	Epivir®
Emtricitabine	FTC	Emtriva®
Abacavir	ABC	Abacavir®
Tenofovir	TDF	Viread®
<b>Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse</b>		
Névirapine	NVP	Viramune®
Efavirenz	EFV	Efavirenz®
Delavirdine	DLV	Rescriptor®
Etravirine	ETV	Intelence®
Rilpivirine	RPV	Edurant®
<b>Combinaisons d'inhibiteurs de la transcriptase inverse</b>		
Zidovudine + lamivudine	AZT + 3TC	Combivir®
Zidovudine + lamivudine + abacavir	AZT + 3TC + ABC	Trizivir®
Tenofovir + emtricitabine + efavirenz	TDF + FTC + EFV	Atripla®
Tenofovir + emtricitabine	TDF+FTC	Truvada®
Emtricitabine + tenofovir + rilpivirine	FTC + TDF + RPV	Complera®
<b>Inhibiteurs de la protéase</b>		
Saquinavir	SQV	Invirase®
Ritonavir	RTV	Norvir®
Indinavir	IDV	Crixivan®
Amprenavir	APV	Agénérase®
Fosamprenavir	fAMP	Telzir®
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra®
Atazanavir	ATZ	Reyataz®
Tipranavir	TPV	Aptivus®
Darunavir	DRV	Prézista®
Nelfinavir	NFV	Viracept

**Tableau IV (suite):** Liste des ARV commercialisés en 2013 (US Food And Drug Administration, 2013)

Dénomination commune internationale (DCI)	Abréviation	Nom de spécialité
<b>Inhibiteurs de fusion</b>		
Enfuvirtide	T20	Fuzéon®
<b>Inhibiteur du corécepteur CCR5</b>		
Maraviroc	MRV	Celsentri®
<b>Inhibiteurs de l'intégrase</b>		
Raltégravir	RAL	Isentress®
Elvitégravir	ELV	Stribild® (ELV, FTC, TDF, Cobicistat)

### 6-2-1 Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles sensibles est un processus à plusieurs étapes qui conduit finalement à la fusion des membranes virale et cellulaire. Chaque étape du processus représente une opportunité pour le développement de médicaments antirétroviraux. Cependant, seules 2 molécules sont aujourd'hui disponibles: le Maraviroc et l'Enfuvirtide. Seule l'Enfuvirtide est utilisée en pédiatrie.

#### 6-2-1-1 Les inhibiteurs d'attachement

Le maraviroc (Celsentri®) est un spirodiketopiperazine, antagoniste du CCR5 doté d'une activité anti VIH-1 puissante aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. C'est un pur antagoniste du CCR5 qui bloque le signal médié par MIP-1- $\alpha$  et RANTES à des concentrations nanomolaires empêchant ainsi la liaison entre la gp120 et le CCR5 et donc l'attachement du virus à la surface de la cellule (Dorr P *et al.*, 2005). Premier antagoniste du CCR5 ayant obtenu son autorisation de mise sur le marché, le Maraviroc est indiqué chez les patients ayant reçu un traitement antirétroviral antérieur et infectés par des virus de tropisme R5, population prédominante tout au long de la maladie. Mais l'utilisation de cette molécule n'est pas encore approuvée en pédiatrie. L'efficacité antirétrovirale du maraviroc en association à d'autres antirétroviraux a été clairement démontrée dans le cadre d'essais cliniques chez des patients en multi échecs (Gulick R M *et al.*, 2008). L'augmentation du taux de CD4 significativement plus importante chez les patients traités par le maraviroc pourrait être le résultat d'un effet spécifique de cette molécule ainsi que d'une meilleure capacité de diffusion dans les compartiments profonds (Dumond J B *et al.*, 2009).

### **6-2-1-2- Les inhibiteurs de fusion**

L'enfuvirtide (T-20) est un oligopeptide synthétique de 36 acides aminés dont la séquence correspond à celle de la région HR-2 de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1. La liaison de l'enfuvirtide au complexe trimérique HR-1 empêche l'association de HR-1 avec HR-2, inhibant ainsi le phénomène de fusion-lyse et bloquant l'entrée du virus (Wild C T *et al.*, 1994). Il s'agit du premier inhibiteur de l'entrée du virus dans la cellule commercialisé à la suite d'essais de phase 3 ayant démontré l'efficacité du médicament lorsqu'il est associé à un traitement antirétroviral optimisé (Lalezari J P *et al.*, 2003; Lazzarin A *et al.*, 2003). Le T-20 est une molécule qui est bien tolérée mais qui est administrée par voie injectable uniquement ; ceci limite son usage dans le long terme du fait de la fréquence des réactions douloureuses au site d'injection. Le T-20 en association, a une efficacité prouvée dans de nombreux travaux où l'administration concomitante de l'enfuvirtide améliore considérablement les taux de réponse aux nouvelles molécules telles que le tipranavir, le darunavir et le maraviroc dans les essais cliniques (Fätkenheuer G *et al.*, 2008, Clotet B *et al.*, 2007). En pédiatrie, l'Enfuvirtide est bien tolérée par les enfants, chez qui la molécule est aussi bien efficace que chez les adultes (Wiznia A *et al.*, 2007)

### **6-2-2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse**

Ils appartiennent à 2 grandes familles de molécules antirétrovirales ayant une action inhibitrice sur le processus de rétro transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire.

#### **6-2-2-1 Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse**

Première famille de molécules antirétrovirales développées, les INTI sont des analogues des nucléosides naturels dont ils diffèrent généralement par l'absence d'hydroxyle en 3'. Ce sont des inhibiteurs compétitifs qui, après avoir subi une triple phosphorylation dans la cellule infectée, agissent au niveau du site de polymérisation de l'enzyme et bloquent l'élongation de l'ADN. Leur intégration dans l'ADN en cours de formation interrompt la réplication en empêchant l'incorporation de nouvelles bases et en bloquant l'élongation de la chaîne d'ADN proviral. Ils sont actifs sur les 2 types de virus VIH-1 et VIH-2. Plusieurs analogues nucléosidiques ont été approuvés par la FDA et sont aujourd'hui vendus: AZT, ddI, d4T, FTC, 3TC et ABC (US Food and Drug Administration, 2013). Leur utilisation chez les enfants est approuvée, et ces molécules existent en formulations pédiatriques. Les analogues nucléotidiques fonctionnent de la même manière que les analogues nucléosidiques mais ils nécessitent une étape de phosphorylation en moins car il s'agit d'un nucléotide

monophosphate. Leur demi-vie intra-cellulaire est beaucoup plus longue que les INTI. Le seul représentant actuel de cette classe est le Ténofovir. Cette molécule suscite beaucoup d'espoir en terme de prévention de l'infection à VIH dans le cadre d'une prophylaxie pré-exposition en administration locale sous forme de gel microbicide (Sokal D C *et al.*, 2012; Rohan L C *et al.*, 2010; Baleta A, 2010) mais aussi en administration orale (Peterson L *et al.*, 2007; Guest G *et al.*, 2010). Le TDF est utilisé chez les enfants, mais il n'y a pas de formulations pédiatriques de ce médicament.

#### **6-2-2-2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse**

Découverts en 1998, les INNTI sont des inhibiteurs non compétitifs de la TI, ils agissent directement au niveau d'une poche hydrophobe, distincte mais proche du site actif de l'enzyme dans la sous-unité p66, sans subir de transformation. L'inhibition de l'enzyme se fait par une distorsion du site polymérasique actif (De Clercq E, 1998).

La poche hydrophobe de la p66 où se lient les INNTI est moins conservée que le site de liaison des dNTPs. Ceci explique certainement la prédisposition du virus à développer rapidement des résistances vis à vis de ces molécules. Ainsi, la barrière génétique vis à vis des INNTI de 1ère génération (Névirapine, Efavirenz, Délavirdine) est faible car une seule mutation au niveau du site de liaison de la molécule suffit pour entraîner une résistance croisée au sein de la classe (De Clercq E, 1998). L'Efavirenz et la Névirapine sont utilisées chez les enfants et existent sous forme liquide.

Cependant, une deuxième génération d'INNTI de barrière génétique plus élevée a vu le jour en 2008 ; c'est le cas de l'étravirine qui est très efficace lorsqu'il est utilisé en trithérapie de 2<sup>ème</sup> ligne chez des patients présentant une résistance multiple aux ARV (Sax PE, 2008 ; Schiller D S *et al.*, 2009). C'est aussi le cas de la rilpivirine, récemment commercialisée et dont l'efficacité a aussi été prouvée (Cohen C J *et al.*, 2012). Parmi ces deux molécules, seule l'étravirine est utilisée chez les enfants. Ce pendant il n'existe pas en formulations pédiatriques.

Les INNTI sont des composés hautement actifs sur le VIH-1 mais ils sont inefficaces sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O du fait d'une résistance naturelle (Balzarini J, 2004).

### **6-2-3 Les inhibiteurs de l'intégrase**

Des progrès remarquables dans le développement des médicaments ont été faits depuis que l'intégrase a été reconnue comme une cible thérapeutique rationnelle pour le traitement de l'infection à VIH. Un inhibiteur de l'intégrase agit dans la phase d'intégration, qui se situe entre la transcription inverse et la maturation, entraînant une diminution de l'intégration du VIH dans les chromosomes de l'hôte (Witvrouw M *et al.*, 2004 ; McColl D J *et al.*, 2010).

Le Raltégravir est le premier inhibiteur d'intégrase approuvé par le FDA pour les patients en échec thérapeutique (en 2007) et par la suite pour les traitements de 1<sup>ère</sup> ligne (FDA notifications, 2009). Il inhibe de façon compétitive la réaction de transfert de brin de l'ADN proviral par liaison avec les ions métalliques dans le site actif (Witvrouw M *et al.*, 2004). Le raltégravir présente une activité contre le VIH-1 et le VIH-2. Il est indiqué pour le traitement des patients en échec virologique, présentant une résistance multiple aux ARV (Stellbrink H J *et al.*, 2009).

L'Elvitégravir est le second inhibiteur d'intégrase qui a été mis au point et approuvé par la FDA en août 2012. Il est utilisé dans une combinaison fixe incluant le FTC, le TDF et le Cobicistat qui est un activateur pharmacocinétique. Cette combinaison fixe a comme avantage de faciliter la posologie qui se résume à la prise quotidienne d'un seul comprimé (Karmon S L et Markowitz M, 2013).

Le Raltégravir est le seul inhibiteur d'intégrase dont l'utilisation chez les enfants est approuvée. Mais cette molécule n'existe pas encore sous une formulation pédiatrique.

### **6-2-4 Les inhibiteurs de la protéase**

La protéase du VIH a été considérée comme une cible potentielle pour un traitement antiviral à partir du moment où il a été démontré qu'une mutation au niveau du gène *pol* de la région des protéases prévenait la maturation du précurseur de la polyprotéine Gag (Oxford J S *et al.*, 1989 ; Park J *et al.*, 1993). Les IP sont conçus à partir de la structure de l'enzyme selon les techniques du modelage moléculaire, en créant des molécules relativement complexes «moulées» sur ce site. Ces molécules ont alors la propriété d'aller occuper le site actif de la protéase avec une haute affinité et donc de bloquer l'activité de l'enzyme à des concentrations remarquablement basses. Ce sont des peptidomimétiques qui se lient de façon compétitive au niveau du site actif de la protéase, et ainsi inhibent la fixation de ses substrats naturels que sont Gag et Gag-pol. Ils bloquent donc la phase tardive de la réplication virale, au moment de la maturation. Les virions produits lors d'un traitement comportant un IP sont ainsi immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules.

Dix IP ont été mis sur le marché depuis 1998 et l'un d'entre eux, le ritonavir, a une action inhibitrice sur le cytochrome P450. Par ailleurs, les IP sont métabolisés par le cytochrome P450. Ainsi, les IP sont généralement administrés en association avec le ritonavir à faible dose de façon à augmenter la demi-vie du produit et par conséquent diminuer le nombre de prise et sa toxicité ; on parle d'IP boosté (von Moltke L L *et al.*, 1998; Lichterfeld M *et al.*, 2003). Les IP sont actifs sur le VIH-1 et le VIH-2.

Plusieurs générations d'IP existent, différant selon leur degré de tolérance et leur barrière génétique. Les IP de 1<sup>ère</sup> génération (Indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir) ont une barrière génétique assez basse favorisant l'émergence rapide de résistance qui est croisée et sont associés à des effets secondaires assez sérieux. Le souci de limiter les effets secondaires des IP et de minimiser le risque d'émergence de mutants résistants a permis le développement de nouvelles générations de molécules qui sont généralement utilisées en cas d'échec thérapeutique de 1<sup>ère</sup> ligne (lopinavir/ritonavir) voire chez des patients présentant une résistance multiple (darunavir, tipranavir) (Vergani B et Rusconi F 2011). Les molécules de la classe des IP sont toutes utilisées chez les enfants. Certaines de ces molécules existent en formulations pédiatriques (Tableau V).

Chacune de ces molécules antirétrovirales peut être utilisée dans le cadre d'une thérapie, qui peut inhiber la réplication virale permettant ainsi de réduire la charge virale du patient à un niveau indétectable. Cependant cette inhibition de la réplication virale dépend essentiellement de 3 facteurs: l'efficacité du traitement antirétroviral administré c'est-à-dire son pouvoir antiviral, la bonne adhésion du patient au traitement, la sensibilité de la souche virale infectante vis-à-vis du traitement administré.

Les molécules ARV sont d'un grand apport dans le traitement de l'infection à VIH, mais ces médicaments ne sont pas toutes approuvées pour une utilisation en pédiatrie.

### **6-3 Molécules antirétrovirales disponibles en pédiatrie**

Les molécules ARV disponibles ne sont pas toutes utilisées en pédiatrie. Actuellement, certaines sont approuvées pour une utilisation chez les enfants (Tableau V) et quelques formulations pédiatriques sont disponibles (Gupta R K *et al.*, 2009 ; Panel on antiretroviral therapy and medical management of HIV-infected children 2012; OMS 2010a). Depuis 2005, il y a eu 5 combinaisons 2 en 1, 4 combinaisons 3 en 1, et 5 préparations dispersibles qui ont été certifiés par l'OMS et la FDA (Waning B *et al.*, 2010).

Au Sénégal, il n'y a que trois classes d'ARV qui sont disponibles au niveau de l'ISAARV, dans le cadre du traitement ARV pédiatrique: les INTI (AZT, 3TC, ABC, d4T,

ddI), les INNTI (NVP, EFV) et les IP (LPV/r, NFV). Des combinaisons fixes sont aussi disponibles, à savoir AZT/3TC, 3TC/ABC, TDF/FTC, AZT/3TC/NVP.

**Tableau V : Molécules ARV disponibles pour le traitement de l'infection à VIH pédiatrique**

Molécule ARV	Restriction d'âge	Formulations disponibles	Conservation
<b>INTI</b>			
AZT	Non	-Liquide -Comprimés -Capsules	-Température ambiante -Sensible à la lumière
d4T	Non	-Liquide -Capsules	-Température ambiante -Réfrigérer le liquide après reconstitution
ABC	≥ 3mois	-Liquide -Comprimés	-Température ambiante -La forme liquide peut être réfrigérée
3TC	Non	-Liquide -Comprimés	Température ambiante
ddI	Non	-Liquide -Comprimés à croquer -Capsules	-Température ambiante -Réfrigérer le liquide
FTC	Non	-Liquide -Comprimés -Capsules	-Température ambiante -Réfrigérer le liquide
TDF	≥ 12 ans	Comprimés	Température ambiante
<b>INNTI</b>			
EFV	≥ 3ans	-Liquide -Comprimés -Capsules	Température ambiante
NVP	Non	-Liquide -Comprimés	Température ambiante
ETV	Non applicable	Comprimés	Température ambiante
<b>IP</b>			
LPV/r	Non	-Liquide -Comprimés	Température ambiante
RTV	Non	-Liquide -Comprimés	-Température ambiante -Sensible à la lumière
SQV	Non applicable	-Comprimés -Capsules	Température ambiante
ATV	≥ 6 ans	Capsules	Température ambiante
DRV	≥ 6 ans	Comprimés	Température ambiante
fAMP	≥ 2 ans	-Liquide -Comprimés	Température ambiante
NFV	≥ 2 ans	-Comprimés -Poudre	Température ambiante
IDV	Non	Capsules	Température ambiante
TPV	≥ 2 ans	-Liquide -Capsules	-Température ambiante -Réfrigérer les capsules
<b>Inhibiteurs d'entrée et inhibiteurs d'intégrase</b>			
ENF	≥ 6ans	Injection	-Poudre stable à température ambiante -Réfrigérer après reconstitution
MVC	Non applicable	Comprimés	Température ambiante
RAL	Non	Comprimés	Température ambiante
<b>Combinaisons 2 en 1 les plus fréquentes</b>			
d4T/3TC	Non	Comprimés	Température ambiante
AZT/3TC	Non	Comprimés	Température ambiante
<b>Combinaisons 3 en 1 les plus fréquentes</b>			
ABC/3TC/AZT	Non	Comprimés	Température ambiante
d4T/3TC/NVP	Non	Comprimés	Au dessous de 25° C
AZT/3TC/NVP	Non	Comprimés	Température ambiante

### 6-3-1 Traitement ARV de première ligne en pédiatrie

L'option de préférence pour une première ligne pour les enfants infectés par le VIH-1 est la combinaison de deux INTI avec un INNTI (Tableau VI). Ces traitements sont efficaces, moins coûteux, disponibles dans les programmes nationaux et une chaîne de froid n'est pas nécessaire. L'AZT et la 3TC sont les deux INTI qui occupent une place majeure dans ce TARV en pédiatrie.

**Tableau VI: Récapitulatif des combinaisons de préférence de première ligne en pédiatrie**  
(Organisation Mondiale de la Santé, 2010a)

Population pédiatrique	Combinaison de première ligne
< 24 mois et pas d'exposition aux ARV	NVP + 2 INTI
< 24 mois avec exposition aux ARV	LPV/r + 2 INTI
< 24 mois et exposition aux ARV inconnue	NVP + 2 INTI
Entre 24 mois et 3 ans	NVP + 2 INTI
> 3 ans	NVP ou EFV + 2 INTI

Chez les enfants qui n'ont pas été exposés aux ARV avant la naissance ou après la naissance, il est recommandé de commencer une trithérapie comprenant la névirapine. L'efavirenz n'est pas utilisé chez les enfants de moins de trois ans à cause du manque d'information sur le dosage.

Chez les enfants de moins de deux ans qui ont été exposés à la névirapine durant la PTME, il est recommandé de débiter le TARV avec une combinaison incluant un inhibiteur de protéase boosté (lopinavir/ritonavir) à cause des problèmes liés à l'émergence de virus résistants à la NVP. Pour les enfants âgés de 2 à 5 ans, la thérapie doit être initiée si le taux de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 25% ou inférieur à 750 cellules/ml. Les enfants âgés de trois ans peuvent démarrer le TARV avec un INNTI et deux INTI. Les enfants âgés de plus de trois ans ayant une co-infection VIH-Tuberculose doivent être mis sous EFV pour éviter l'interaction entre la NVP et la rifampicine. Chez les adolescents de plus de 12 ans avec co-infection VIH-hépatite B, la combinaison recommandée est TDF+FTC/3TC+NVP/EFV (OMS, 2010a). Cette combinaison a pour avantage d'avoir deux molécules efficaces pour le traitement de l'hépatite B. L'EFV doit être évitée chez les jeunes adolescentes à cause de son effet tératogène dans le premier trimestre de la grossesse, et aussi chez les enfants de moins de trois ans vu le manque d'information sur le dosage.

L'utilisation de combinaisons comprenant trois INTI peut être envisagée comme traitement de première intention dans certains cas comme la co-infection VIH-TB chez les

enfants de moins de 3 ans pour qui l'EFV ne peut pas être utilisé en substitution à la NVP. Pour tout TARV, il est important de s'assurer d'une adhérence > 90% pour maximiser les bénéfices à long terme d'une suppression virale, d'une amélioration immunologique et d'un meilleur état clinique.

Le Co-trimoxazole (CTX) est donné en prophylaxie à tous les enfants exposés à partir de 6 semaines jusqu'à l'âge de 5 ans quelque soit le stade clinique et l'état immunologique car cela permet une prophylaxie contre les infections infantiles. Si l'infection à VIH est exclue ou l'enfant âgé de plus de 5 ans est sous ARV avec un taux de lymphocytes T CD4 >25%, le CTX peut être arrêté (OMS, 2010a).

### 6-3-2 Choix de la seconde ligne de traitement ARV pédiatrique

Dans le but d'une meilleure prise en charge des patients, l'OMS recommande que les enfants en échec de la première ligne composée de deux INTI et d'un INNTI, soient mis sous une deuxième ligne incluant un inhibiteur de la protéase boosté par le ritonavir, et deux INTI (Tableau VII). Si le test de résistance est disponible, le choix des molécules de deuxième ligne sera effectué sur la base du profil de résistance.

**Tableau VII: Première et deuxième ligne de préférence en pédiatrie** (Organisation Mondiale de la Santé 2010a).

Population pédiatrique	Première ligne	Deuxième ligne
< 24 mois et pas d'exposition aux ARV	NVP + 2 INTI	LPV/r + 2 INTI
< 24 mois avec exposition aux INNTI	LPV/r + 2 INTI	1 INNTI + 2 INTI
< 24 mois et exposition aux ARV inconnue	NVP + 2 INTI	LPV/r + 2 INTI
≥ 24 mois	1 INNTI + 2 INTI	LPV/r + 2 INTI

Les recommandations de 2010 ont été révisées en juin 2013, et tous les enfants de moins de 5 ans chez qui l'infection à VIH est diagnostiquée, doivent être mis sous TARV. Pour tout enfant de moins de 2 ans, le LPV/r est la molécule recommandée en première ligne, quelle que soit l'exposition aux INNTI (Organisation Mondiale de la Santé, 2013).

## 7- Monitoring et suivi de l'enfant sous TARV

Après avoir mis un enfant sous ARV, il est important de faire un suivi clinique fréquent. Ces visites permettront d'évaluer la croissance et le développement, le statut immuno-virologique, et de prodiguer des conseils en nutrition (Organisation Mondiale de la Santé 2010a).

## 7-1 Numération des lymphocytes T CD4

Selon les recommandations de l’OMS, un test de numération des lymphocytes TCD4 doit être effectué au moment où le diagnostic de l’infection à VIH est posé. Le suivi de la numération des lymphocytes T CD4 + doit être plus fréquent quand leur nombre s’approche du seuil pour commencer un TARV. Ce test devra être effectué avant de commencer un TARV, puis chaque semestre après avoir débuté le traitement. En cas de survenue d’une nouvelle pathologie définissant l’un des stades cliniques de l’OMS notamment en cas de cassure de la courbe de croissance ou de retard dans le développement neurologique il faudra aussi faire une numération des lymphocytes T CD4+ . Lorsque les capacités pour réaliser un test de numération des lymphocytes T CD4+ sont limitées, il faudra faire des tests ciblés pour évaluer l’importance des pathologies cliniques.

Le taux de lymphocytes T CD4+ est un paramètre important dans le monitoring du traitement ARV chez les patients infectés (Mellors J W *et al.*, 1997 ; Gulick R M *et al.*, 1997 ; Hammer S M *et al.*, 2006 ; O’Brien W A *et al.*, 1997). Le suivi du taux de lymphocytes T CD4+ est très important car une baisse des lymphocytes T CD4+ est un bon prédicateur de la progression de la maladie (Ghaffari G *et al.*, 2004). Le tableau VIII regroupe les données concernant les réponses immunologiques et virologiques du traitement ARV chez les enfants vivants dans les pays à ressources limitées (George E *et al.*, 2007; Janssens B *et al.*, 2007 ; Bolton-Moore *Cet al.*, 2007 ; Reddi A *et al.*, 2007 ; Song R *et al.*, 2007a ; Puthanakit T *et al.*, 2005 ; Puthanakit T *et al.*, 2009 ; Kumarasamy N *et al.*, 2009). Du fait des difficultés technologiques et des ressources limitées, les tests de détermination du taux de lymphocytes T CD4+ ne sont pas toujours disponibles dans les programmes existants dans les pays en développement, et même lorsque c’est disponible, des mesures fréquentes ne sont pas toujours effectuées, comme indiquée au niveau du tableau VIII. Dans ces études, en moyenne, les enfants doubleraient leur nombre de lymphocytes T CD4+ après 6 mois de traitement ARV. Ce taux de lymphocytes T CD4+ continue d’augmenter au même rythme durant le second semestre de traitement et ralenti par la suite. Le gain en lymphocytes T CD4+ à 18 mois de traitement n’était pas vraiment différent de celui à 12 mois de traitement ARV. Dans l’étude Zambienne, où les valeurs des taux de lymphocytes T CD4+ étaient disponibles pour certains patients à 24 mois de traitement, il n’y avait pas une augmentation significative entre 12 et 24 mois (Bolton Moore C *et al.*, 2007).

Du fait de la diminution naturelle et de la variation du nombre absolu de lymphocytes T CD4+ chez l’enfant (Wade A M et Ades A E, 1998; Stein D S *et al.*, 1992), le pourcentage

est utilisé pour suivre la progression de la maladie, surtout chez les enfants de moins de 5 ans (Hughes M D *et al.*, 1994).

**Tableau VIII: Evaluation immuno-virologique du traitement antirétroviral chez les enfants vivants avec le VIH, dans les pays à ressources limitées.**

Etude	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Moyenne des études
Nombre d'enfants	2928	67	151	29	107	212	285	274	67	250	78	-
Pays	Zambie (Bolton-Moore <i>et al.</i> , 2007)	Inde (Kumar asamy <i>et al.</i> , 2009)	Afrique du Sud (Reddi <i>et al.</i> , 2007)	Kenya (Song <i>et al.</i> , 2007a)	Thaïland (Puthana kit <i>et al.</i> , 2005)	Cambodge (Janssen <i>et al.</i> , 2007)	Haiti (George <i>et al.</i> , 2007)	Thaïland (Puthana kit <i>et al.</i> , 2009)	Kenya (Wamalwa <i>et al.</i> , 2007)	Ouganda (Kamya <i>et al.</i> , 2007)	Côte d'Ivoire (Rouet <i>et al.</i> , 2006)	-
Age médian (années)	6,75	6,28	5,3	8,5	7,7	6	6,3	7	4,4	9,2	6,5	6,7
CD4 à baseligne (cellules/ml)	284	225	na	182,3	72	100	608	na	288	272	na	253,9
Gain en CD4 à 6 mois	280	478	na	203	226	na	na	na	210	na	na	279,4
Gain en CD4 à 12 mois	351	516	na	334	332	490	na	na	na	na	na	404,6
Gain en CD4 à 18# ou 24 mois	427#	493#	na	na	532	na	na	na	na	na	na	460
Pourcentage médian de CD4 à baseligne	12,9	12	7,4	na	3	6	12	5	5,8	8,6	7,5	8,02
Gain de CD4 en pourcentage à 6 mois	10,8	8	10,2	na	12	na	na	7	9,4	na	4,6	8,86
Gain de CD4 en pourcentage à 12 mois	14,1	11	16,2	na	17	17	10,3	na	na	na	11,1	13,8
Gain de CD4 en pourcentage à 18# ou 24 mois	15,1#	13#	na	na	21	na	na	18	na	na	16	19,5
Charge virale (CV) médiane à baseligne (Log copies/ml)	na	na	na	5,11	5,4	na	5,3	na	6,1	5,3	5,37	5,43
Proportion avec CV indétectable à 6 mois (%)	na	na	84	50	53	na	na	na	67	na	52,1	61,2
Proportion avec CV indétectable à 12 mois (%)	na	na	80,3	na	69	81	56	na	na	74	49,3	68,26
Proportion avec CV indétectable à 18 mois (%)	na	na	na	na	76	na	na	na	na	na	47,5	61,75
Fréquence de détermination des CD4 (mois)	6	3-6	6	3	6	6	6	na	3-6	3-6	6	-

# :valeurs à 18 mois na: non applicable

A côté de l'évaluation immunologique, estb aussi effectuée une évaluation virologique, par la détermination de la charge virale.

## **7-2 La charge virale**

La charge virale est un outil important dans le monitoring du traitement ARV (Hammer S M *et al.*, 2006). Selon l’OMS, un test de mesure de la charge virale est souhaitable avant de commencer un TARV, mais il n’est pas indispensable. Quand cela est possible, la charge virale doit être mesurée pour confirmer un échec clinique ou un échec immunologique avant de changer le schéma thérapeutique (OMS, 2010a).

Les enfants infectés par le VIH atteignent une suppression virale totale plus lentement que les adultes sous traitement ARV (De Rossi A 2004, van Rossum A M *et al.*, 2002, Fraaij P L *et al.*, 2005). Le succès virologique chez les enfants reste moyen avec un taux de 61,75% à 18 mois de traitement (Tableau VIII). Rien que 3 de ces études ont montré une charge virale à au moins trois points durant le suivi. Cela est dû à l’indisponibilité de la charge virale à grande échelle. Les tests restent jusqu’à présent chers et les équipements sont sophistiqués.

La charge virale est un outil capital pour une détection des échecs thérapeutiques, d’où toute son importance dans les pays en développement, où les options de seconde ligne de traitement sont limitées. Ces échecs thérapeutiques sont le résultat de l’émergence de mutations de résistance. Ce phénomène de résistance est parfois la conséquence d’une mauvaise observance du patient.

## **7-3 Observance du traitement ARV**

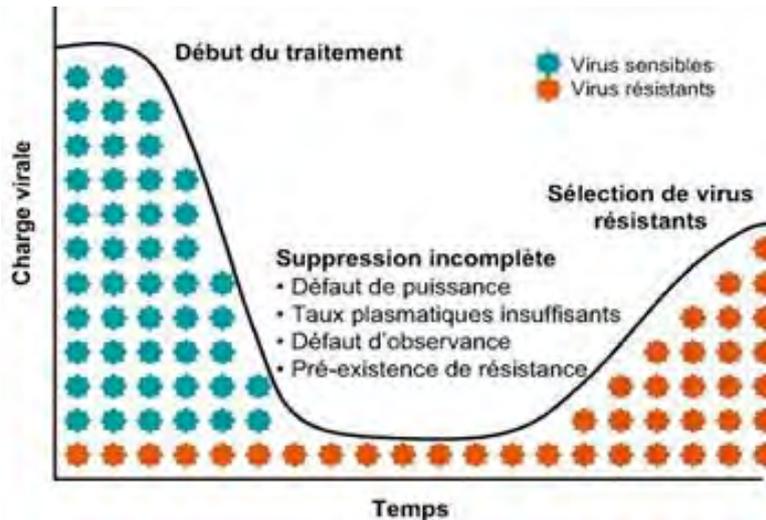
L’adhérence au traitement ARV est un pré requis pour l’efficacité de tout traitement ARV (Paterson D L *et al.*, 2000 ; Harries A D *et al.*, 2004). Dans les pays à ressources limitées où les schémas de seconde ligne ne sont pas disponibles en grand nombre, il est important de maintenir un patient en première ligne aussi longtemps que possible. Les patients et leurs tuteurs doivent être sensibilisés sur l’importance de l’adhérence, et cette adhérence doit être évaluée à chaque rencontre avec le patient. Certaines études ont permis d’évaluer l’adhérence chez les enfants dans les pays à ressources limitées (Reddi A *et al.*, 2007 ; Wamalwa D C *et al.*, 2007 ; Elise A *et al.*, 2005 ; Nyandiko W M *et al.*, 2006 ; Bikaako-Kajura W *et al.*, 2006 ; Nabukeera-Barungi N *et al.*, 2007). Il y a plusieurs façons d’évaluer l’adhérence, exemple, rapport personnel ou les moniteurs électroniques sophistiqués (Wendel C S *et al.*, 2001; Miller L G *et al.*, 2002). Vu les moyens limités, le rapport des personnes sur l’adhérence est plus utilisé dans les pays en voie de développement. Une étude comparative de différentes méthodes d’évaluation de l’adhérence a été effectuée. Les différentes méthodes étaient: le rapport des personnes prenant soin de l’enfant, le décompte de comprimés lors de visites programmées dans les structures sanitaires, et le décompte de

comprimés lors des visites à domicile. La proportion de patients ayant eu une parfaite adhérence (>95%) était de 72%, 89% et 94% lorsqu'on utilisait le décompte de comprimés lors des visites à domicile, le rapport des personnes prenant soin de l'enfant et le décompte de comprimés lors de visites programmées dans les structures sanitaires, respectivement (Nabukeera-Barungi N *et al.*, 2007). Bien que l'importance de l'adhérence soit reconnue, il n'existe pas de consensus sur la méthode d'évaluation de ce paramètre. Cependant la meilleure méthode d'évaluer l'adhérence reste l'évaluation virologique. D'où la nécessité d'inclure la charge virale dans la prise en charge des enfants infectés par le VIH.

Le traitement ARV a été d'un grand apport dans le suivi des enfants infectés par le VIH. Grâce à ces molécules, les enfants verticalement infectés parviennent à vivre plus longtemps. Il existe toutefois de nombreux obstacles à cette efficacité thérapeutique tels que les effets indésirables, la pénétration limitée des médicaments dans certains réservoirs particuliers de la réplication du virus, l'observance du traitement, les co-infections avec d'autres agents pathogènes et l'émergence de souches virales résistantes. Cette survenue de résistance aux ARV est l'une des causes majeures de l'échec thérapeutique.

## **8- La résistance du VIH aux molécules antirétrovirales**

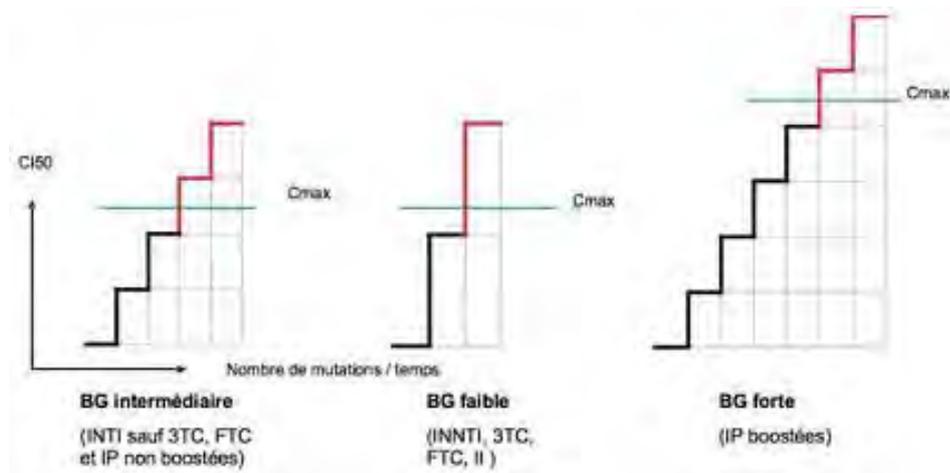
La résistance aux antirétroviraux est liée à la présence de quasi-espèces virales présentant des mutations sur le génome viral qui réduisent la sensibilité du virus par rapport à celle d'un virus sauvage. La résistance peut être naturelle, comme celle du VIH-2 pour les INNTI (Balzarini J, 2004). Elle peut être transmise, c'est-à-dire en l'absence de traitement préalable. La souche sauvage a une capacité répliquative meilleure que les souches mutées qui ne seront plus détectées par les tests de routine au fur et à mesure de l'évolution de l'infection. La résistance peut être également secondaire, acquise, liée à l'émergence de souches comportant des mutations dans les gènes qui codent les cibles des antirétroviraux sous l'effet de la pression de sélection d'un traitement non optimal (figure 23).



**Figure 23: Schématisation de la sélection de mutants résistants sous la pression de sélection des antirétroviraux (Delaugerre C *et al.*, 2007)**

### 8-1 Mécanismes généraux

Il existe une relation directe entre la persistance de la réplication virale sous un traitement et l'émergence d'une souche virale résistante à celui-ci. La suppression incomplète de la réplication virale peut être liée à différents facteurs : préexistence de mutations de résistance ; défaut de puissance du traitement antirétroviral c'est-à-dire incapacité du traitement à réduire rapidement la charge virale; mauvaise observance, interactions médicamenteuses ou malabsorption induisant des concentrations sériques d'antiviraux insuffisantes. Certains facteurs cellulaires, tels que des défauts de métabolisation ou des mécanismes d'efflux, pourraient également être un facteur favorisant le développement de la résistance mais leur implication est encore mal connue. Ces souches résistantes ont le plus souvent une capacité répliquative inférieure à celle de la population sauvage (Delaugerre C *et al.*, 2007). Les mutations sont responsables de modifications structurales ou fonctionnelles des cibles des antirétroviraux. Cependant, le nombre et le type de mutations entraînant un phénomène de résistance est variable selon la molécule antivirale concernée. Par exemple, la résistance aux INNTI est un phénomène de « tout ou rien » liée à une seule mutation qui va entraîner une résistance croisée à tous les INNTI de première génération. Ces molécules ont une faible barrière génétique (figure 24) à l'inverse des inhibiteurs de protéase pour lesquels plusieurs mutations sont nécessaires pour induire une résistance (Kempf D J *et al.*, 2001).



### Figure 24: Barrière génétique des ARV

Chaque marche représente une nouvelle mutation de résistance (Kempf D J *et al.*, 2001). Alors qu'une seule mutation confère une résistance aux INNTI dont la barrière génétique est faible, une accumulation de mutations est nécessaire pour conférer une résistance aux IP boostés. Leur barrière génétique est forte.

BG: barrière génétique

## 8-2 Principaux mécanismes de résistance par classe

### 8-2-1 INTI

Les inhibiteurs nucléos(t)idiques de la TI sont des analogues des nucléosides ou nucléotides naturels avec lesquels ils entrent en compétition. Quand ils sont incorporés, ils bloquent l'élongation de la chaîne car ils n'ont pas de groupement OH en 3'. Deux mécanismes principaux sont impliqués dans la résistance aux INTI (Hirsch M S *et al.*, 2008). Le premier consiste en l'excision de l'analogue nucléosidique incorporé qui permet la reprise de l'élongation de la chaîne. Ces mutations sont appelées TAM (thymidine analog mutations). Elles comprennent un groupe de 6 mutations, dont la plus fréquente est la T215Y/F (le nombre 215 représente la position de l'acide aminé; l'acide aminé normal est mentionné à gauche du nombre et celui muté se trouve à sa droite) et sont sélectionnées par les analogues de la thymidine (AZT, d4T). Ces TAM, en fonction du nombre de mutations, peuvent être responsables de résistances croisées aux autres INTI, sauf à la lamivudine. Le deuxième mécanisme est lié à la diminution de l'incorporation des nucléos(t)ides artificiels au profit des nucléosides naturels induite par des mutations au site actif de l'enzyme ou à distance. Par exemple, la mutation M184V/I induite par la lamivudine survient dans le motif YMDD de la polymérase. Cette mutation pourrait gêner le fonctionnement de l'enzyme en diminuant la

capacité répliquative du virus et retarder l'apparition des TAM. La mutation K65R principalement sélectionnée par le ténofovir contribuerait à la résistance par un mécanisme mixte. La présence de certaines TAMs semble contrecarrer l'apparition de cette mutation par un mécanisme de compétition mutationnelle. La prescription de zidovudine (AZT) associée au ténofovir pourrait préserver de la survenue de la K65R (vonWyl V *et al.*, 2008). En dehors de ces mécanismes fréquents, il a été montré que des mutations dans la région de la RNase H et dans la région de connexion pourraient induire des résistances aux INTI mais aussi aux INNTI (Hirsch M S *et al.*, 2008; Brehm J H *et al.*, 2007). Ces régions ne sont pas analysées en routine. La barrière génétique de ces antirétroviraux est variable selon les molécules: faible pour la lamivudine, élevée pour le ténofovir en dehors de la K65R.

### **8-2-2 INNTI**

Les inhibiteurs non nucléosidiques inhibent la TI de façon non compétitive en se fixant directement sur une poche hydrophobe de l'enzyme située près du site actif et en empêchant la mobilité de certains domaines de la TI. Les mutations de résistance sont observées des deux côtés de la poche hydrophobe ou sur la seconde sous-unité de la TI (Delaugerre C et Chaix M L, 2006). Un seul changement d'acide aminé entraîne une diminution de l'affinité de l'inhibiteur. La résistance apparaît très vite après l'échappement du fait de l'absence d'effet sur le fitness viral, les virus se répliquant aussi bien sans et avec mutations. Le site de fixation étant le même pour tous les INNTI de première génération, cette résistance est alors croisée. L'étravirine et le Rilpivirine qui sont des INNTI de deuxième génération, ont une barrière génétique plus élevée. Sous efavirenz, la mutation K103N est retrouvée chez 90 % des patients, seule ou en association avec d'autres mutations si la pression de sélection est maintenue. Ces associations augmentent le niveau de résistance et peuvent réduire l'efficacité de l'étravirine. Trois, voire quatre mutations sont nécessaires pour en diminuer la réponse virologique (Delaugerre C, 2008). La mutation E138K semble être responsable d'une diminution de la sensibilité à la Rilpivirine, mais à l'instar de l'Etravirine, cette molécule a une barrière génétique élevée, d'où la nécessité de l'émergence de plusieurs mutations pour que la résistance soit effective (Wainberg M, 2013 ; Azijn H *et al.*, 2010).

### **8-2-3 Inhibiteurs de protéase**

Les IP interviennent tardivement dans le cycle viral en bloquant l'action de la protéase qui clive les polypeptides précurseurs. Ils empêchent ainsi la maturation des néo-virions qui ne pourront pas infecter d'autres cellules. La résistance aux IP est liée à l'accumulation de mutations dont toutes n'ont pas le même impact. Les mutations primaires, qui sont les premières à apparaître, diminuent la liaison des IP à leur substrat enzymatique en agrandissant le site de fixation. Elles sont fréquemment situées au site de l'enzyme comme les mutations des codons 82 ou 84, mais parfois à distance comme celle du codon 90. Des mutations de ces codons sont sélectionnées par l'indinavir, le saquinavir et le lopinavir. Les mutations secondaires renforcent la résistance ou modifient la capacité catalytique de la protéase. Certaines mutations sont spécifiques d'un IP donné mais la plupart sont communes à plusieurs IP. La résistance aux IP pourrait aussi provenir de mutations situées en dehors de la protéase, notamment sur les sites de clivage dans le gène *gag* (Hirsch M S *et al.*, 2008). Ces mutations sont déjà connues pour augmenter la résistance phénotypique et aussi pour améliorer la capacité répliquative. Les nouveaux IP, comme le tipranavir, sélectionnent également des mutations telles que l'I84V, responsables de résistances croisées. Il faut cependant un nombre plus grand de mutations pour voir leur efficacité réduite. La barrière génétique des IP est généralement élevée, la résistance n'apparaissant qu'avec l'accumulation de mutations. La potentialisation par le ritonavir diminue l'apparition de mutations de résistance en cas d'échappement et augmente la barrière génétique initiale de l'IP.

### **8-2-4 Inhibiteurs d'intégrase**

L'intégrase du VIH agit à plusieurs niveaux : elle se fixe à l'extrémité de l'ADN du VIH après rétrotranscription pour digérer l'extrémité 3' puis elle insère l'ADN-VIH proviral dans l'ADN génomique. Les inhibiteurs d'intégration actuellement utilisés se fixent sur le complexe ADN viral-intégrase au niveau du site catalytique de l'enzyme et bloquent la fixation sur l'ADN cellulaire. Les mutations de résistance apparaissent autour du site catalytique de l'enzyme. Elles entraînent des changements conformationnels qui diminuent l'affinité de l'inhibiteur qui ne peut plus chélater les cations nécessaires au fonctionnement de l'enzyme. Différentes mutations sont impliquées dans la résistance au raltégravir dont les deux principales sont Q148H/K/R et N155H (Delaugerre C et Chaix M L, 2006; Malet I *et al.*, 2008). La barrière génétique de ces antirétroviraux est faible, une seule mutation suffit pour induire une résistance. Il existe une résistance croisée importante pour certaines mutations entre raltégravir et elvitégravir. Le développement de mutations de résistance (en particulier N

155H) est associé à une diminution de la capacité répliquative (Delaugerre C, 2008 ; Roquebert B *et al.*, 2009).

### **8-2-5 Inhibiteurs d'entrée**

Dans cette classe figurent les inhibiteurs d'attachement et les inhibiteurs de fusion.

#### **8-2-5-1 Inhibiteurs d'attachement**

La liaison gp120-CD4 provoque un changement de conformation de l'enveloppe qui va permettre à ce complexe d'interagir avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4 par l'intermédiaire de la boucle V3. Les inhibiteurs de CCR5 bloquent l'interaction de la gp120 avec le CCR5 en modifiant sa conformation. Ces antirétroviraux sont efficaces sur les virus à tropisme R5 mais pas sur ceux à tropisme R4 ou mixte R5+X4 ou sur les doubles populations R5/X4. Deux voies d'échappement à ces antiviraux ont été décrites. La première correspond au changement de tropisme du virus par l'émergence de souches de tropisme CXCR4 préexistantes sous forme d'une population minoritaire non initialement détectée (Nedellec R *et al.*, 2011 ; Kuhmann S E *et al.*, 2008 ; Tsibris A M *et al.*, 2007). La deuxième voie consiste en l'apparition de mutations dans la boucle V3 ou dans d'autres régions de la gp120. Bien que les mutations des acides aminés 13 et 26 semblent importantes, aucune signature spécifique de résistance n'a été à ce jour identifiée (Nedellec R *et al.*, 2011 ; Hirsch M S *et al.*, 2008). Ces mutations seraient spécifiques d'un composé, ce qui pourrait limiter la résistance croisée. Il n'y a pas de résistance croisée entre inhibiteurs de CCR5 et les autres classes thérapeutiques (Marcelin A G et Calvez V, 2007).

#### **8-2-5-2 Inhibiteurs de fusion**

Inhibiteur de fusion : l'enfuvirtide ou T20 est un petit peptide qui mime une portion de la région répétée (HR2) de la gp41. Il se lie à la région HR1 de la gp41 et bloque son changement conformationnel qui permet l'insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire. La résistance au T20 est liée à l'acquisition par le virus de mutations dans la région HR-1 du gène de la gp41 dans une région allant des acides aminés 36 à 45 (Delaugerre C, 2008; Marcelin A G et Calvez V, 2007). Ces mutations apparaissent en quelques semaines en cas de persistance de la réplication sous enfuvirtide (Marcelin A G et Calvez V, 2007). Il existe une grande variabilité dans la baisse de sensibilité phénotypique selon les mutations considérées. Certaines entraînent une résistance de haut niveau. Par exemple la V38A induit une augmentation de la concentration inhibitrice 50 % (CI50) de 30 fois par rapport à un virus sauvage. La barrière génétique de l'enfuvirtide doit être considérée comme faible. Des

mutations sont sélectionnées plus tardivement dans HR2 mais elles n'ont pas d'impact sur la résistance et sont considérées comme des mutations compensatrices pour la capacité répliquative.

L'ensemble de ces mutations de résistance sont détectées grâce à des outils performants.

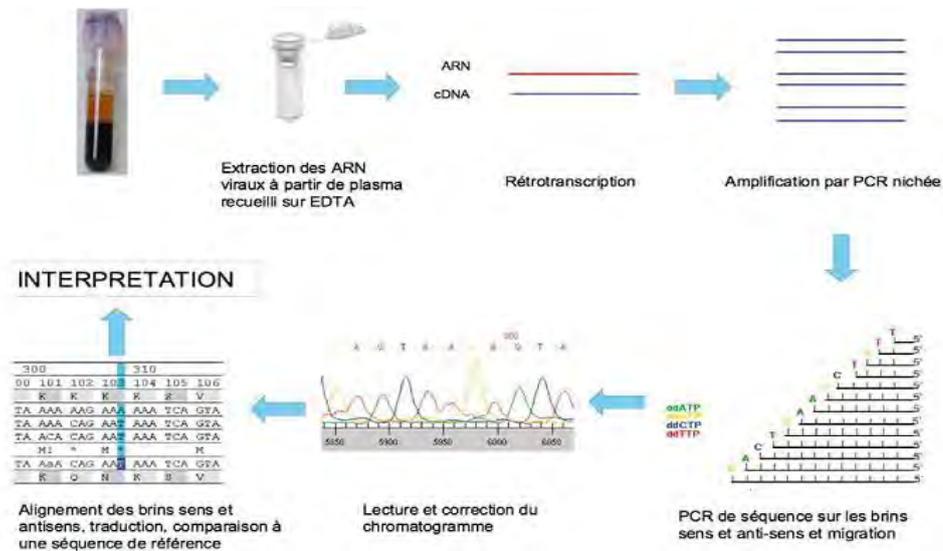
### **8-3 Outils de détection de la résistance**

Pour évaluer la résistance des souches virales, des techniques telles que le génotypage, le phénotypage, les tests de tropisme, le phénotype virtuel, le quotient d'inhibition génotypique, sont utilisées. Parmi ces tests, la détermination du génotype de résistance s'est imposée comme la technique de référence pour le monitoring des patients en routine.

#### **8-3-1 Les tests génotypiques**

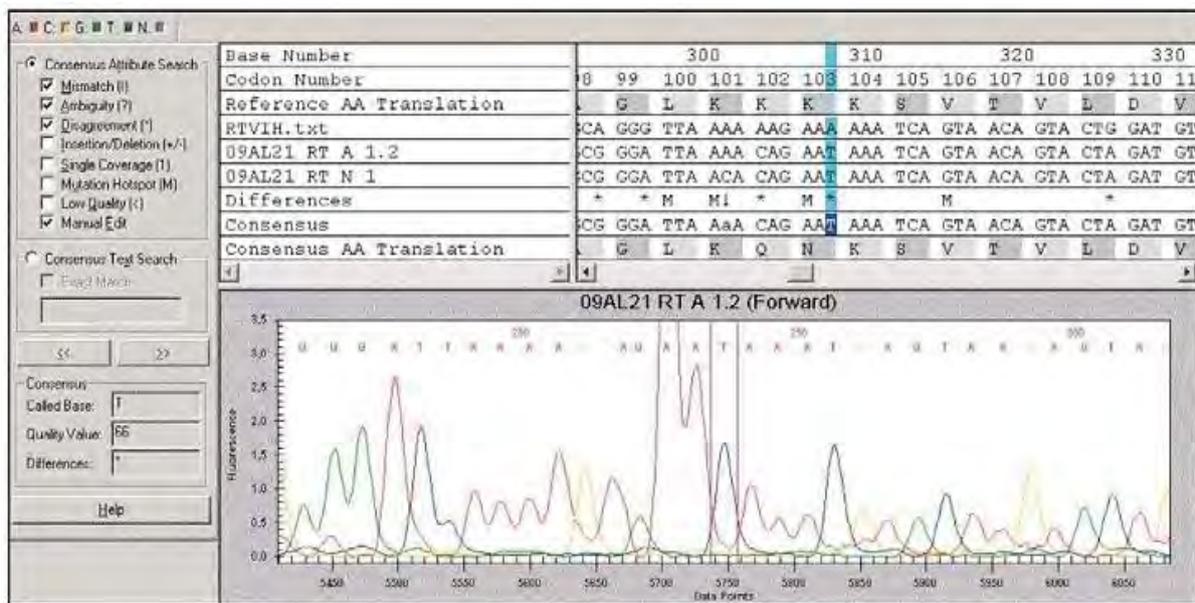
##### **8-3-1-1 Technique**

Les techniques de routine reposent sur le séquençage par méthode de Sanger, après amplification par RT-PCR, des gènes codant les protéines cibles des antirétroviraux : TI, PR, IN ou gp41. Le génotypage est réalisé à partir de plasma recueilli sur EDTA et rapidement décanté. La technique comporte différentes étapes résumées dans la (figure 25). La séquence d'acides nucléiques obtenue à partir de l'analyse des deux brins d'ADN est traduite en acides aminés car seules les mutations non silencieuses sont prises en compte. La séquence est comparée à une séquence de référence (séquence consensus d'une souche sensible) (figure 26). Chaque codon est analysé et classé en codon sauvage, muté ou mixte quand coexiste une double population. Bien que des kits commerciaux soient disponibles (Trugene® HIV-1 Genotyping Assay, (Siemens) et ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System, (Abbott)), plusieurs laboratoires utilisent des techniques différentes dont celles du groupe AC11 de l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org/>) et de l'IRD (Vergne *et al.*, 2000) qui ont l'avantage de permettre la recherche de mutations sur des cibles plus larges à un coût moindre, et d'être mieux adaptées aux souches non B.



**Figure 25: Principales étapes de réalisation des génotypes de résistance (Bigaillon C *et al.*, 2010)**

Après centrifugation, les ARN viraux contenus dans le plasma sont extraits puis rétrotranscrits en ADNc. Les gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR nichée puis séquencés. Les deux brins obtenus sont alignés, traduits et comparés à une séquence de référence. Les mutations observées sont ensuite interprétées.



**Figure 26: Comparaison d'une séquence de la TI à la séquence de référence (Bigaillon C *et al.*, 2010)**

Mise en évidence de la mutation K103N conférant une résistance aux INNTI

### **8-3-1-2 Interprétation**

Les mutations obtenues doivent être interprétées afin de différencier celles qui sont dues au polymorphisme du virus de celles qui sont responsables de résistances. Il est important pour le biologiste de disposer des renseignements cliniques nécessaires à l'interprétation : contexte de réalisation du test, traitements suivis. Des règles d'interprétation appelées algorithmes permettent d'évaluer la réponse à un antiviral en fonction des associations de mutations présentes. La réalisation des algorithmes se base sur les mutations observées *in vitro* en présence de l'antiviral et la résistance qu'elles induisent, la mise en évidence de résistances croisées par la corrélation entre génotype et phénotype de souches caractérisées puis la corrélation entre profils de mutation et réponse virologique chez le patient traité, les mutations induites *in vivo* n'étant toujours pas les mêmes que celles observées *in vitro*. Ces algorithmes dont celui du groupe AC11 de l'ANRS ou de l'université de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) sont mis à jour régulièrement à partir des nouvelles données de résistance disponibles. Les résultats rendus comprennent le sous-type et les mutations de résistance avec leur interprétation par antiviral (résistance, résistance possible ou sensible). Les mutations de polymorphisme sont signalées. Une fois l'interprétation réalisée, il est possible de calculer le GSS (genotypic sensitivity score) qui représente la somme des médicaments actifs selon l'algorithme utilisé. Bracciale *et al.* ont montré la prédictivité de ce score pour la réponse thérapeutique (Bracciale L *et al.*, 2009).

### **8-3-2 Les tests phénotypiques**

En marge des tests génotypiques, les tests phénotypiques ne sont pas utilisés en routine mais leur intérêt persiste dans l'évaluation de nouvelles molécules et chez les patients multi traités. Ils consistent en la mesure de la croissance virale en système cellulaire sous l'effet de concentrations croissantes de l'ARV. La concentration inhibant 50 % et 90 % de la multiplication virale est calculée par rapport à une souche de référence sensible. Certaines firmes proposent des tests utilisant des virus recombinants (Antivirogram de Virco, PhenoSense de Monogram ou Phenoscript d'Eurofins Scientifique) qui facilitent leur réalisation. Cette technique est complexe, de longue durée et n'évalue qu'un antiviral à la fois.

### **8-3-3 Les tests de tropisme**

La détermination du tropisme viral CCR5 ou CXCR4 est un préalable impératif avant la mise sous inhibiteurs de CCR5. Pour déterminer le tropisme, des tests phénotypiques utilisant des virus recombinants sont utilisés : Phenoscript® (VIRallianceeurofins), Trofile™

(Monogram Biosciences). Ces tests ont les mêmes limites que les tests phénotypiques de détection de la résistance : ils nécessitent une charge virale d'au moins 1 000 copies/ml et ils ne permettent pas de différencier les souches ayant un double tropisme R5/X4 d'un mélange de deux populations distinctes (Low A J *et al.*, 2008). Leur coût et la durée de réalisation font que la détermination du tropisme par génotypage de la boucle V3 de la gp120 est de plus en plus utilisée. Le génotypage a une concordance de 72 à 81 % avec les tests phénotypiques mais ne permet pas non plus de différencier les virus X4 de virus mixtes (Svicher V *et al.*, 2010; Poveda E *et al.*, 2009). Un test génotypique permettant d'utiliser aussi bien l'ARN que l'ADN a été mis au point, et une concordance de 90% a été retrouvée entre les deux types de matériel génétique (Paar C *et al.*, 2011).

#### **8-3-4 Le phénotype virtuel**

Enfin, le phénotype virtuel est une alternative développée par le laboratoire Virco qui consiste en la comparaison des séquences génotypiques avec celles des patients dont le phénotype est connu et enregistré dans une base de données. Le résultat est rendu comme une estimation du phénotype théorique. Une étude comparative a permis de montrer la concordance entre le rapport de résistance de la base de données de l'Université de Stanford et le test de phénotype virtuel de Virco (Jiamsakul A *et al.*, 2012). Mais des discordances ont cependant été notées concernant l'efavirenz. Le test de phénotype virtuel n'est que progressivement applicable aux nouvelles molécules ou aux génotypes rares en fonction de l'actualisation de la base de données.

#### **8-3-5 Détermination du quotient d'inhibition génotypique (QIG)**

Le concept de QIG a débuté avec la classe des IP car leur concentration plasmatique peut être modulée et leur barrière génétique est élevée. Le QIG est le rapport de la concentration plasmatique résiduelle de l'IP par rapport au nombre de mutations associées à une résistance à l'IP. Il serait plus prédictif de la réponse virologique que ne le sont séparément les paramètres qui servent à le calculer. Il n'est pas utilisé en routine actuellement du fait d'un manque de standardisation (Bigaillon C *et al.*, 2010).

Les tests génotypiques standards sont d'une grande importance dans la détermination des profils de résistance du VIH. Cependant, ces techniques, ne permettent pas de détecter les mutations de résistance présentes au niveau des populations virales représentant moins de 20% de la population virale globale. Des techniques dites ultra sensibles ont été développées pour caractériser ces variants minoritaires résistants.

### **8-3-6 Tests ultra sensibles pour la détection des variants minoritaires résistants**

Ces techniques de détection des populations virales minoritaires sortent actuellement du cadre de la pratique clinique et sont réservées aux protocoles de recherche. Ces méthodes ultrasensibles sont basées sur deux approches majeures : la PCR spécifique de codon, et le séquençage ultrasensible.

La PCR spécifique de codon est un test hautement sensible et très spécifique pour la détection de mutations de résistance présentes au niveau de populations virales minoritaires. Le test est basé sur la PCR en temps réel, avec une utilisation d'amorces spécifiques de souches mutées et de souches sauvages (Paredes R *et al.*, 2007 ; Charpentier C *et al.*, 2010 ; Guo D X *et al.*, 2010). C'est une technique facile à réaliser et dont le coût n'est pas très élevé. Les résultats sont généralement faciles à interpréter mais il ne permet que la détection d'une mutation à la fois. Cette méthodologie est convenable pour les études épidémiologiques sur la persistance de mutations de résistance (Hauser A *et al.*, 2012 ; Pilger D *et al.*, 2011 ; Metzner K J *et al.*, 2011 ; Charpentier C *et al.*, 2010). Mais ce test ne permet pas de détecter toutes les mutations de résistance présentes en cas d'échec thérapeutique par exemple.

Contrairement à la PCR spécifique de codon, le séquençage ultrasensible permet d'analyser des séquences entières. La technique se caractérise par l'utilisation d'approches massivement parallèles, permettant de séquencer des centaines de milliers de fragments simultanément. Mais la technique est onéreuse et plus difficile à réaliser, ce qui limite son accessibilité (Messiaen P *et al.*, 2012 ; Armenia D *et al.*, 2012).

Une mauvaise adhérence, des taux plasmatiques d'ARV inadéquats ou une résistance primaire peuvent contribuer à un échec de la thérapie ARV. Quand l'échec thérapeutique est confirmé, un changement de traitement devient alors nécessaire.

## **9- L'échec thérapeutique en pédiatrie**

L'objectif du traitement ARV est de maintenir la charge virale indétectable, ce qui permet une restauration du système immunitaire et une amélioration de l'état clinique du patient. Dans le cas où les virus sont résistants, le traitement ARV devient inefficace et on parle alors d'échec thérapeutique. Cela se manifeste aussi bien au plan clinique qu'au plan immuno-virologique.

### **9-1 Critères cliniques**

La réapparition d'un stade clinique OMS 3 ou 4 chez un enfant sous ARV bien observant, devrait attirer l'attention sur une progression de la maladie, reflétant un échec thérapeutique (Organisation Mondiale de la Santé, 2010a).

### **9-2 Critères immunologiques**

Selon les nouvelles recommandations de l'OMS, l'échec immunologique est défini chez l'enfant lorsqu'il atteint le seuil immunologique en fonction de son âge (ou y retourne) après au moins 24 semaines sous TARV, alors qu'il adhère au traitement, le seuil étant :

- CD4 < 200 cellules/mm<sup>3</sup> ou pourcentage de CD4 < 10 % chez un enfant âgé de 2 ans à moins de 5 ans.

- CD4 < 100 cellules/mm<sup>3</sup> chez un enfant âgé de 5 ans ou plus.

L'identification d'un échec thérapeutique sur la base de valeurs immunologiques se fait en comparant le nombre de lymphocytes T CD4+ avec d'autres mesures de ce paramètre réalisées précédemment ; cela souligne le besoin d'une numération des lymphocytes T CD4+ avant de commencer un TAR. Il faut aussi s'assurer qu'il n'y a pas d'autres infections qui pourraient être à l'origine de la baisse de lymphocytes T CD4+.

### **9-3 Critères virologiques**

Sur le plan virologique, l'échec thérapeutique peut être mis en évidence par un échec virologique qui est aujourd'hui marqué par une charge virale supérieure à 5000 copies/ml (OMS, 2010a) si l'enfant est adhérent au TARV depuis plus de 24 semaines après initiation du traitement. Dans les pays à ressources limitées, il est parfois difficile d'avoir la charge virale. Ce marqueur n'est pas encore un pré requis pour débiter le traitement ARV ou pour la détermination de l'échec thérapeutique.

La résistance du VIH-1 aux ARV dans les cohortes pédiatriques est de plus en plus observée dans les pays à ressources limitées. Il est de ce fait nécessaire de mener un bon monitoring au laboratoire pour une détection précoce des échecs virologiques. Cela permettra de faire les tests de résistance à temps, de changer les traitements (si cela est nécessaire) en se basant sur les profils de résistance et de préserver ainsi les futures options thérapeutiques.

# **Deuxième Partie:**

## Analyse des travaux

# 1- Contexte

## 1-1 Informations générales sur le Sénégal

### 1-1-1 Situation géographique et population

La République du Sénégal est située dans la partie la plus occidentale du continent Africain dans la zone soudano sahélienne comprise entre 12°8 et 16°41 de latitude Nord et 11°21 et 17°32 de longitude Ouest. D'une superficie de 196.722 km<sup>2</sup>, il est limité au Nord par la Mauritanie, au Sud par la République de Guinée et la Guinée Bissau, à l'Est par le Mali et à l'Ouest par l'Océan Atlantique.

En 2011, sa population était estimée à 12 855 153 habitants avec un taux d'accroissement moyen annuel de 2,79%. En d'autres termes, cette population augmente de plus de 900 personnes par jour. Le nombre de femmes est légèrement plus élevé que celui des hommes, avec 6 506 575 femmes (50,6%) contre 6 348 578 hommes (49,4%). Cette population croît rapidement, avec un indice de fécondité de 5 enfants par femme. La population est relativement jeune : 42,6 % ont moins de 15 ans. Les personnes en âge d'activité représentent 53,8% et celles âgées de 60 ans et plus constituent 5,2%. ([http://www.ansd.sn/publications\\_SES.html](http://www.ansd.sn/publications_SES.html)) (site consulté en avril 2013).

### 1-1-2 Situation sanitaire

Le système de santé du Sénégal se présente sous forme de pyramide à 3 niveaux. Il est composé des structures publiques suivantes :

- 14 régions médicales
- 25 hôpitaux, 23 fonctionnels
- 76 districts sanitaires
- 89 centres de santé dont 20 sont en réalité des postes de santé faisant office de centre de santé
- 1 240 postes de santé dont 1214 fonctionnels
- 129 maternités
- 2 098 cases de santé
- 06 établissements publics de santé non hospitaliers.

Outre ces structures publiques, le système de santé sénégalais comprend 555 cabinets médicaux privés, 37 cliniques privées, 570 cabinets para médicaux privés, 23 structures d'entreprise et 77 postes de santé privés.

(Ministère de la Santé et de la Prévention, 2011).

Ces deux dernières décennies sont marquées par une amélioration de la situation sanitaire au niveau du pays. Les taux de mortalité infantile et infanto-juvénile bien qu'encore élevés, ont connu une baisse significative. En effet, le taux de mortalité infanto-juvénile est passé de 121‰ en 2005 à 72‰ en 2010 et celui de la mortalité infantile est passée de 61‰ en 2005 à 47‰ en 2010. Enfin, la mortalité maternelle de 401 pour 100 000 naissances vivantes en 2005 est tombée à 392 pour 100 000 naissances vivantes en 2010 (Conseil National de Lutte contre le Sida 2012).

### **1-1-3 Situation épidémiologique du VIH/SIDA**

Les données épidémiologiques sur l'infection à VIH sont issues du programme de surveillance sentinelle couvrant plusieurs sites dans le pays depuis 1989. Ce programme a pour mission d'établir les prévalences annuelles de l'infection à VIH et de la syphilis, mais aussi de donner les tendances évolutives et de faire des estimations. Il ciblait différents groupes de populations choisis en fonction de leur vulnérabilité à savoir les hommes porteurs d'infections sexuellement transmissibles (IST), les malades hospitalisés dans les services de médecine et de maladies infectieuses, les tuberculeux, les femmes enceintes et les travailleuses du sexe.

Ce programme, qui s'est étendu à l'ensemble du territoire national, a évolué en intégrant la surveillance comportementale par le diagnostic des IST à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce programme de surveillance ont permis de classer le Sénégal en pays à épidémie concentrée selon la classification de la Banque Mondiale et de l'ONUSIDA, avec une prévalence faible de 0,9% en 2011 chez les femmes enceintes (Conseil National de lutte contre le SIDA, 2013). Dans le groupe vulnérable des travailleuses du sexe, cette prévalence était de 20% en 2009 (Conseil National de lutte contre le SIDA, 2012). Cependant il existe une disparité au niveau régionale, les régions du sud du pays étant les plus touchées par l'épidémie.

### **1-1-4 SIDA pédiatrique au Sénégal**

Selon les données épidémiologiques de la Division de Lutte contre le SIDA, en 2012, le nombre d'enfants vivant avec le VIH était estimé à 6103. Cette même année, le nombre de nouveaux cas d'enfants infectés était de 322.

Les deux grands centres de prise en charge pédiatrique du VIH se trouvent dans la région de Dakar. Il s'agit de l'hôpital d'enfants Albert Royer situé en ville, et du Centre de

Santé Roi Baudouin situé à Guédiawaye dans la banlieue dakaroise. En 2012, le nombre total d'enfants infectés par le VIH, suivis dans ces deux centres principaux était de 446 avec 346 enfants sous ARV. La grande majorité des enfants sont infectés par le VIH-1. Il n'y a que 8 enfants qui sont infectés par le VIH-2, représentant 1,7% des enfants suivis dans ces deux structures.

Une étude sur le taux de TME a été réalisée par la Division de Lutte Contre le SIDA et les IST. Elle couvrait la période allant de janvier 2008 à décembre 2010 et les résultats en avaient découlés montraient un taux de TME de 6%. Ce taux reste élevé par rapport à l'objectif national qui est de le maintenir au dessous de 2%. Cependant, chez les enfants qui ont bénéficié d'une prophylaxie ARV complète cette TME était de 1,1% (Division de lutte contre le SIDA et les IST, 2012a).

## **2- Cadre de l'étude et justificatifs**

Nos travaux ont eu pour cadre l'unité de Biologie Moléculaire du laboratoire de Bactériologie-Virologie (LBV) du centre hospitalo-universitaire Aristide Le Dantec (Dakar, Sénégal). Il s'agit du laboratoire de référence national des IST et du VIH/SIDA qui, en partenariat avec le programme national de lutte contre le SIDA, a initié dès 1985 des programmes de recherche sur les rétrovirus humains. Ces programmes, en collaboration avec des équipes européennes, américaines et africaines, sont sous la responsabilité du Professeur Souleymane Mboup. Ils ont débuté avec la convention de recherche inter-universitaire sur les rétrovirus signée entre les universités de Dakar, Tours, Limoges et Harvard qui a permis en 1986 la première description puis la caractérisation du VIH-2.

Les premiers programmes ont tout d'abord ciblé la population vulnérable des travailleuses du sexe. Les différentes études menées au sein de cette population ont permis une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de l'infection au Sénégal et des différences de pathogénicité entre les virus VIH-1 et VIH-2 mais aussi la caractérisation moléculaire des souches de VIH-1 circulant chez les travailleuses du sexe au Sénégal.

En 1995, de nombreux travaux portant sur le polymorphisme génétique du VIH-1 ont été menés au sein de la population générale par le LBV en collaboration avec le laboratoire des rétrovirus à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier. Ces deux laboratoires sont des centres collaborateurs de l'ONUSIDA qui s'intéressent à la problématique de la diversité génétique et ses conséquences. Ces travaux ont permis d'établir la présence du VIH-1 groupe O dans différents pays africains dont le Sénégal, la cartographie

des souches de VIH-1 circulant en Afrique de l'Ouest et la caractérisation de plusieurs formes recombinantes circulantes à travers les pays du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA.

En 2006, une collaboration avec le laboratoire de virologie de l'hôpital européen Georges Pompidou a été établie. Ce partenariat a permis de mener plusieurs travaux en particulier sur l'herpès, la résistance du VIH-1 aux ARV, et d'organiser des sessions de formation en virologie.

En 1998, la thérapie antirétrovirale débuta grâce à l'Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux (ISAARV) autour de projets de recherche sur la faisabilité, l'efficacité et la pérennité des TARV dans les pays du Sud. En 2001, c'est le début de la décentralisation du TARV avec la gratuité totale du traitement et du suivi immuno-virologique en 2003.

Dans le cadre de la PTME, le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois a été initié au Sénégal en 2000. Le passage à l'échelle des activités de la PTME a été effectif à partir de 2005 avec une décentralisation au niveau des centres de santé. Le programme PTME a intégré le diagnostic précoce des enfants nés de mère séropositive depuis 2007, avec une progression des sites de prélèvements sur papier buvard couvrant en 2011 l'ensemble des centres de santé et des hôpitaux. Le nombre d'enfants nés de mère séropositive ayant bénéficié du prélèvement sur papier buvard pour la première PCR est passé de 339 en 2008 à 409 en 2009 et 577 en 2010 (Conseil National de Lutte contre le SIDA, 2012).

Le papier buvard comme support de prélèvement a été d'une importance capitale dans le diagnostic néonatal de l'infection à VIH. C'est grâce à ce support de prélèvement qu'il a été possible de faire bénéficier le diagnostic néonatal aux enfants nés de mère séropositive vivant dans des régions très éloignées du laboratoire de référence. Jusqu'en 2010, ce diagnostic n'était effectué que par le laboratoire de Bactériologie Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec Dakar. Ce n'est qu'en début 2011 que ce test a commencé à être réalisé au laboratoire de Virologie de l'Hôpital Régional de Thiès à 70 kilomètres de Dakar.

En 2011, le pourcentage d'enfants nés de mère séropositive au VIH, ayant subi un test virologique au cours de leurs deux premiers mois de vie n'était que 7,6% (Conseil National de lutte contre le SIDA, 2012). Pour permettre une meilleure prise en charge des enfants infectés, il est nécessaire d'accélérer la décentralisation des services de dépistage néonatal de l'infection à VIH et d'envisager l'implantation de plateformes de ce diagnostic néonatal dans plusieurs sites au niveau du pays. Il est donc important de disposer de techniques faciles

d'utilisation comme le NucliSENS, qui seraient appropriées pour ces sites éloignés du centre de référence.

Avec l'ISAARV, le diagnostic positif des enfants a permis de pouvoir les mettre sous TARV. Cette disponibilité des ARV a engendré la mise en place de stratégie de lutte contre la transmission verticale du VIH. En pédiatrie, le TARV reste difficile à mener à bien à cause de plusieurs facteurs contraignants. Dans ce contexte actuel d'accès universel aux ARV, des études ont montré la survenue de mutations de résistance à ces molécules. En plus cette résistance est observée aussi bien chez les patients étant sous trithérapie que chez ceux qui en sont naïfs. Vu l'absence de documentation concernant la prévalence de la résistance en milieu pédiatrique au Sénégal, il était nécessaire d'entreprendre des recherches dans ce domaine.

Les travaux que nous avons menés, s'inscrivent dans cette thématique de suivi virologique de l'infection à VIH chez les enfants avec pour principal objectif, une contribution à l'amélioration de la prise en charge de l'infection à VIH en pédiatrie, grâce à une évaluation de certains aspects virologiques.

Les objectifs spécifiques étaient :

- d'évaluer le NucliSENS pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH
- d'étudier la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les enfants en échec virologique
- d'étudier l'archivage de souches virales résistantes chez les enfants naïfs de trithérapie ARV

Nos travaux ont été effectués en alternance entre le laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec de Dakar et le laboratoire de Virologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou de Paris.

### **3- Analyse des travaux**

# ARN versus ADN pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH-1: Evaluation du NucliSENSEasyQ

## Article 1

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2011, p. 2590–2593  
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02402-10  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No.

### RNA versus DNA (NucliSENS EasyQ HIV-1 v1.2 versus Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5) for Early Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants in Senegal<sup>∇</sup>

K. Kébé, O. Ndiaye, H. Diop Ndiaye, P. Mbakob Mengue, P. M. M. Guindo, S. Diallo, N. Léye, S. B. Gueye, A. Gaye Diallo, C. Touré Kane,\* and S. Mboup

## 1- Problématique

La transmission mère enfant est la cause la plus significative de l'infection à VIH et de la mortalité chez les enfants de moins de 15 ans spécialement durant les 24 premiers mois de vie, ce qui crée le besoin urgent d'une prise en charge précoce de ces enfants. Des études récentes décrivant la gestion et la prise en charge des nouveaux nés infectés par le VIH ont montré que le traitement antirétroviral devrait être débuté pendant les trois premiers mois de vie (Violari A *et al.*, 2008). Cela ne pourrait se faire que par le biais d'un dépistage néonatal de l'infection par le VIH. Cependant l'accessibilité peut être un facteur limitant car les tests sérologiques standards ne peuvent pas être utilisés chez le nouveau né à cause de la persistance des anticorps maternels jusqu'à 18 mois de vie (Rakusan TA *et al.*, 1991). Ce diagnostic est alors basé sur d'autres tests comme la culture virale (McIntosh K *et al.*, 1994), l'antigénémie P24 et la détection du matériel génétique du virus (Steketee R W *et al.*, 1997). Cependant, les deux premières méthodes sont liées à plusieurs contraintes, entraînant ainsi l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire pour ce type de diagnostic. L'amplification de l'ADN proviral reste la technique de référence pour ce diagnostic (Fransen K P *et al.*, 1994).

Aujourd'hui, la grande sensibilité des techniques de quantification de l'ARN permet leur substitution aux tests de PCR ADN (Lilian R R *et al.*, 2010 ; Rouet F *et al.*, 2001 ; Stevens W *et al.*, 2004). Ces tests ARN sont le plus souvent automatisés et facile à implémenter dans des zones éloignées des centres de référence. Cela va permettre de les utiliser pour le diagnostic de l'infection, car beaucoup d'enfants infectés vivant en zones reculées n'ont pas l'opportunité d'en bénéficier avant l'âge de 18 mois.

Comme composante de la PTME au Sénégal, le diagnostic néonatal a débuté par une phase pilote en 2000 avec une technique maison de PCR ADN qualitative. En 2007 la plateforme Amplicor HIV-1 DNA Test a été introduite avec l'utilisation du papier buvard (DBS pour Dried Blood Spot). La disponibilité des techniques ARN au Sénégal, comme dans d'autres pays, et la validation de la quantification de l'ARN sur DBS (Kane C T *et al.*, 2008 ; Reigadas, S *et al.*, 2009 ; Leelawiwat W *et al.*, 2009) ont permis d'évaluer leur utilisation dans le diagnostic néonatal.

## **2- Objectifs**

L'objectif de notre travail était d'évaluer la capacité de détection de l'ARN du VIH-1 par le NucliSENS comparativement à la référence Amplicor, qui détecte l'ADN proviral, et d'améliorer le diagnostic néonatal au Sénégal.

## **3- Méthodologie**

Des échantillons de sang ont été collectés d'enfants nés de mères infectées par le VIH-1. Deux types de prélèvements ont été collectés : du sang total sur tube contenant de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et des DBS. Les prélèvements de sang total sur tube (n=43) ont été obtenus au niveau des sites de PTME situés à Dakar et sa banlieue, et les DBS (n=149) ont été collectés au niveau de sites situés dans les autres régions du Sénégal.

Pour évaluer les performances du NucliSENS, l'Amplicor a été utilisé comme technique de référence. Les analyses statistiques ont été effectuées par EPI INFO version 6 et Microsoft Excel 2003.

L'exactitude du diagnostic du NucliSENS a été évaluée en calculant la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN). Le logiciel Statcalc a été utilisé pour déterminer le coefficient Kappa.

## **4- Résultats**

### **4-1 Comparaison en utilisant les buffycoat**

Parmi les 43 prélèvements de sang sur tube EDTA, l'ARN du VIH-1 a été détecté dans le plasma de 10 patients par le NucliSENS, et ces 10 patients ont aussi eu un résultat positif sur le Amplicor en utilisant les buffycoat correspondant.

Le NucliSENS a montré une sensibilité et une spécificité de 100% (Tableau IX). Les VPP et VPN étaient de 100%. Une parfaite concordance a été trouvée entre les deux plateformes en utilisant les prélèvements de sang total sur tube, avec un coefficient Kappa de 1 ( $p < 0,001$ )

### **4-2 Comparaison avec les DBS**

L'ARN du VIH-1 a été détecté par le NucliSENS dans les 19 DBS qui avaient aussi des résultats positifs sur l'Amplicor. Il n'y a pas eu de prélèvement positif sur Amplicor et négatif sur le NucliSENS. Les analyses statistiques ont donné un coefficient Kappa de 1 ( $p < 0,001$ ), montrant une parfaite concordance entre les deux plateformes avec le DBS

(Tableau XI). La comparaison de performance entre le NucliSENS et l'Amplior a montré une sensibilité de 100% (IC 95% : 79,1-100%), une spécificité de 100% (IC 95% : 96,4-100%), une VPP de 100% (IC 95% : 79,1-100%) et une VPN de 100% (IC 95% : 96,4-100%).

### **4-3 Charges virales et densités optiques**

La charge virale médiane était élevée et égale à 410 000 IU/ml (1900-59 000 000 IU/ml). La densité optique médiane était de 2,951 (1,073-3,129). Une valeur  $\geq$  5000 IU/ml était considérée comme positive alors que pour une valeur  $<$ 5000 IU/ml le test devrait être refait en faisant une nouvelle extraction de l'échantillon.

## **5- Conclusion**

La plateforme NucliSENS constitue une bonne alternative pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH, vue sa bonne sensibilité et spécificité. Cette plateforme donne des informations aussi bien sur l'infection du patient que sur la charge virale. Ce diagnostic néonatal constitue une étape fondamentale dans la prise en charge pédiatrique, car c'est à la connaissance du statut positif de l'enfant, qu'il est alors mis sous ARV. Cette thérapie ARV se trouve parfois entravée par une perte de sensibilité des souches virales aux molécules utilisées, entraînée par une émergence de mutations de résistance sous la pression médicamenteuse.

Cette préoccupation nous a conduits à évaluer le niveau de résistance chez les enfants sous ARV depuis au moins 6 mois.

# Etude de la résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez des enfants en première ligne de traitement

## Article 2

AID-2011-0300-ver9-Kebe\_1P.3d 07/26/12 3:39pm Page 1

AID-2011-0300-ver9-Kebe\_1P  
Type: research-article

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES  
Volume 28, Number 00, 2012  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/aid.2011.0300

## High Rate Of Antiretroviral Drug Resistance Mutations in HIV Type 1-Infected Senegalese Children in Virological Failure on First-Line Treatment According to the World Health Organization Guidelines

Khady Kebe,<sup>1</sup> Moussa Thiam,<sup>1</sup> Ndeye Rama Diagne Gueye,<sup>2</sup> Halimatou Diop,<sup>1</sup> Aïchatou Dia,<sup>2</sup>  
Haby Signate Sy,<sup>2</sup> Charlotte Charpentier,<sup>3</sup> Laurent Belec,<sup>3</sup> Souleymane Mboup,<sup>1</sup> and Coumba Toure Kane<sup>1</sup>

## 1- Problématique

Les enfants sont très vulnérables à l'infection à VIH, et à l'échec thérapeutique surtout dans les pays à ressources limitées. Des études précédentes sur le TARV chez les enfants ont mis en évidence certaines difficultés dans le traitement du SIDA pédiatrique en Afrique subsaharienne (Sigaloff K C *et al.*, 2011). Les principaux facteurs compromettant l'efficacité du TARV chez les enfants comprennent le nombre limité de formulations pédiatriques, la mauvaise observance et des charges virales très élevées, ce qui pourrait favoriser le risque de l'échec thérapeutique engendré par l'émergence de résistance (Chaix M L *et al.*, 2005 ; Averbuch D *et al.*, 2006 ; Lwembe R *et al.*, 2007 ; Adjé-Touré C *et al.*, 2008 ; Gody J C *et al.*, 2008). Alors que l'échec virologique (EV) est variablement défini selon les études, de hauts niveaux d'EV ont été rapportés chez les enfants africains traités avec les ARV, allant de 13% à 75% (Chaix M L *et al.*, 2005; Gody J C *et al.*, 2008 ; Vaz P *et al.*, 2009 ; Germanaud D *et al.*, 2010 ; Ruel T D *et al.*, 2011; Sigaloff K C *et al.*, 2011). En plus les variantes du VIH-1 résistants à au moins une molécule ARV ont été retrouvés dans 71% à 100% des enfants ayant une charge virale détectable (Chaix M L *et al.*, 2005 ; Lwembe R *et al.*, 2007 ; Vaz P *et al.*, 2009., Germanaud D *et al.*, 2010 ; Charpentier C *et al.*, 2012 ; Sigaloff K C *et al.*, 2011). Depuis plus de 10 ans, le Sénégal a développé un programme opérationnel et structuré pour prévenir la propagation de l'infection à VIH et donner des soins de santé aux patients VIH. Chez les adultes, le taux de succès thérapeutique est similaire à celui observé dans les pays développés, atteignant 84% après 24 mois de thérapie (Vergne L *et al.*, 2003). Cependant les cohortes pédiatriques sénégalaises recevant des ARV n'ont pas jusqu'à présent fait l'objet d'une évaluation biologique, malgré le risque d'échec thérapeutique chez les enfants sous TARV antérieurement rapporté dans certains pays africains (Charpentier C *et al.*, 2012 ; Sigaloff K C *et al.*, 2011). Cela nous a incités à faire une évaluation virologique dans une cohorte d'enfants infectés par le VIH-1 recevant le traitement de première ligne selon les recommandations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé, 2006), et suivis dans le centre de référence de la prise en charge pédiatrique.

## 2- Objectifs

Notre étude avait pour but d'évaluer l'EV de même que l'échec thérapeutique et la résistance, dans une cohorte d'enfants infectés par le VIH-1 recevant le traitement de première intention.

## **3- Méthodologie**

### **3-1 Population d'étude**

Une étude transversale a été conduite chez des enfants suivis à l'hôpital Albert Royer de Dakar. Des patients âgés de 15 ans au plus, et traités avec des INTI et des INNTI comme schéma de première ligne pendant au moins 6 mois, ont été inclus.

### **3-2 Analyses virologiques**

La charge virale a été mesurée par la plateforme m2000 Real Time HIV-1 des laboratoires Abbott (Schutten M *et al.*, 2007).

Les tests de résistance ont été effectués chez les enfants qui avaient une charge virale  $\geq 3 \log_{10}$  copies/ml au moment de l'analyse virologique. Le séquençage de la protéase et de la reverse transcriptase a été effectué selon le protocole de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites, comme précédemment décrit (Pasquier C *et al.*, 2001). La résistance génotypique a été identifiée en utilisant la base de données de l'université de Stanford (<http://hivdb.srtanford.edu>). Pour classer les souches de VIH-1 selon les sous types, des analyses phylogénétiques ont été effectuées par référence au programme Rega (de Oliveira T *et al.*, 2005).

## **4- Résultats**

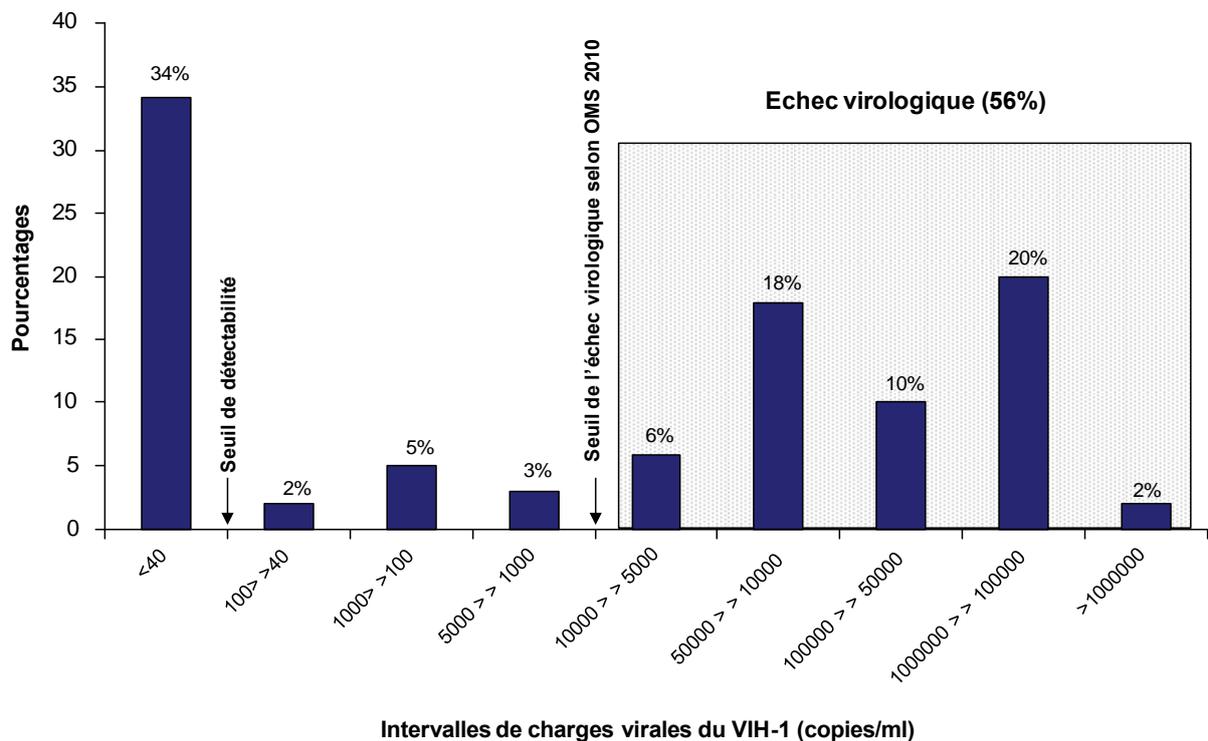
### **4-1 Population d'étude et distribution des charges virales**

Un nombre total de 125 enfants de moins de 15 ans, infectés par le VIH-1 recevant le traitement de première ligne pendant au moins 6 mois ont été inclus. L'âge médian était de 7 ans (2-15 ans). La combinaison thérapeutique la plus fréquente était AZT/3TC/NVP. La durée médiane de traitement était de 20 mois (6-120 mois).

Les taux d'EV selon les critères de l'OMS 2010 après 6, 12 et 24 mois de TARV étaient de 32%, 53% et 55% respectivement.

Chez les 125 enfants, 43 (34%) avaient une charge virale indétectable alors que 82 (66%) avaient une virémie détectable, avec une valeur médiane de  $5 \log_{10}$  copies/ml ( $2-7 \log_{10}$  copies/ml) (figure 27).

Le pourcentage d'épisodes d'interruption de traitement ARV était plus élevé chez les enfants avec une charge virale détectable que ceux avec une charge virale indétectable ( $p < 0,025$  par le test  $\chi^2$ ).



**Figure 27: Distribution des valeurs de charge virale plasmatique chez les 125 enfants**

Le seuil de détection de la plateforme Abbott m2000 RealTime HIV-1 assay (40 copies/ml), et le seuil de l'échec virologique selon les recommandations de l'OMS 2010 (5000 ou 3.7 log<sub>10</sub>copies/ml) sont indiqués par les flèches.

#### 4-2 Profils de résistance génotypiques

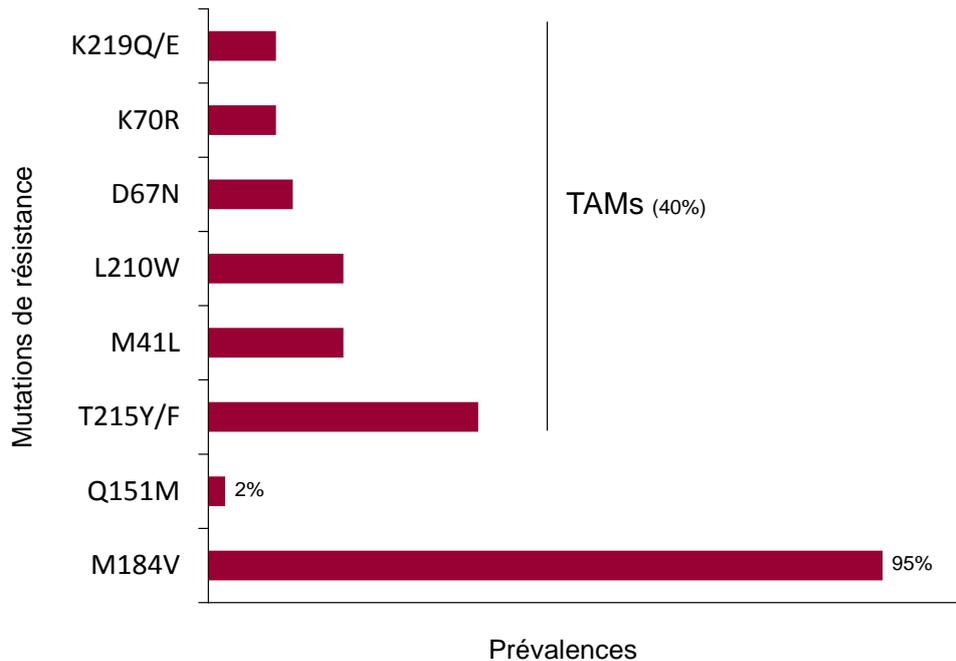
Les résultats de génotypage étaient disponibles pour 52 enfants qui avaient une charge virale supérieure à 3 log<sub>10</sub> copies/ml. La charge virale médiane au moment du génotypage était de 4,9 log<sub>10</sub> copies/ml (3,2-6,8 log<sub>10</sub> copies/ml). Selon les enregistrements au niveau de la pharmacie, au moins une interruption de traitement était survenue chez 45 (87%) enfants parmi les 52.

La résistance à au moins une molécule ARV a été retrouvée chez 48 (92%) des enfants, et une double résistance aux INTI et aux INNTI était retrouvée chez 42 (88%) des enfants.

Trois enfants parmi les 48 (6%) pour qui il y avait des virus résistants, avaient des charges virales comprises entre 3 et 3,7 log<sub>10</sub> copies/ml. Selon les nouvelles recommandations de l'OMS (2010) sur l'EV, ces enfants ne seraient pas considérés comme étant en EV.

### 4-3 Mutations de résistance aux INTI

Des mutations majeures conférant une résistance aux INTI ont été observées au niveau de virus isolés à partir de 42 (88%) parmi les 48 enfants avec résistance. La mutation M184V/I a été identifiée chez 40 (95%) parmi les 42 enfants ayant des virus résistants aux INTI (figure 28).



**Figure 28 : Prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.** Mutations aux INTI observées chez 42 enfants suivis à l'hôpital d'enfants Albert Royer de Dakar, recevant un traitement ARV de première ligne pour une durée médiane de 26 mois, et qui avaient une charge virale plasmatique  $\geq 3.0 \log_{10}$  copies/ml.  
TAMs: Thymidine-analogue mutations (mutations analogues de la thymidine).

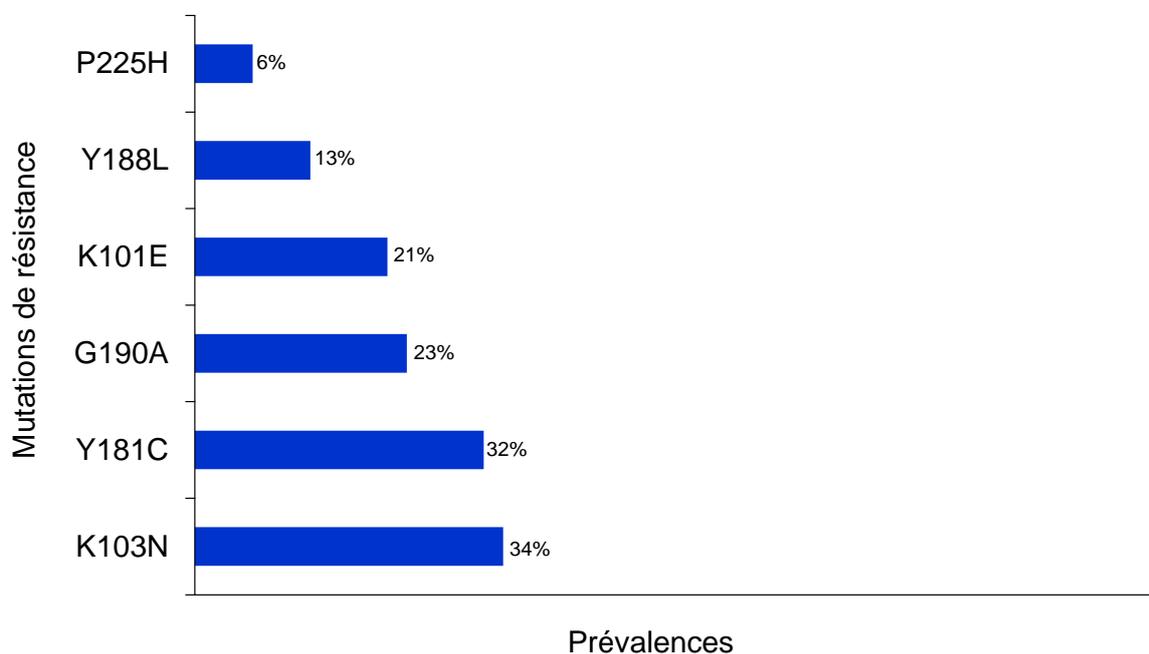
Les mutations analogues de la thymidine (TAM, thymidine analogue mutations) étaient présentes chez 17 (40%) parmi les 42 enfants.

Une multi résistance aux INTI a été observée chez 18 enfants (43%) parmi les 42 ayant des virus résistants aux INTI.

#### 4-4 Mutations de résistance aux INNTI

Au moins une mutation de résistance aux INNTI a été retrouvée chez 47 (99%) parmi les 48 enfants qui avaient des virus résistants aux ARV. Les mutations de résistance aux INNTI retrouvées étaient: K103N chez 16 (34%), Y181C chez 15 (32%), G190A chez 11 (23%) et K101E chez 10 (21%) (figure 29).

Une multi résistance aux INNTI a été retrouvée chez 27 enfants (57%) parmi les 47 qui avaient une résistance aux INNTI.



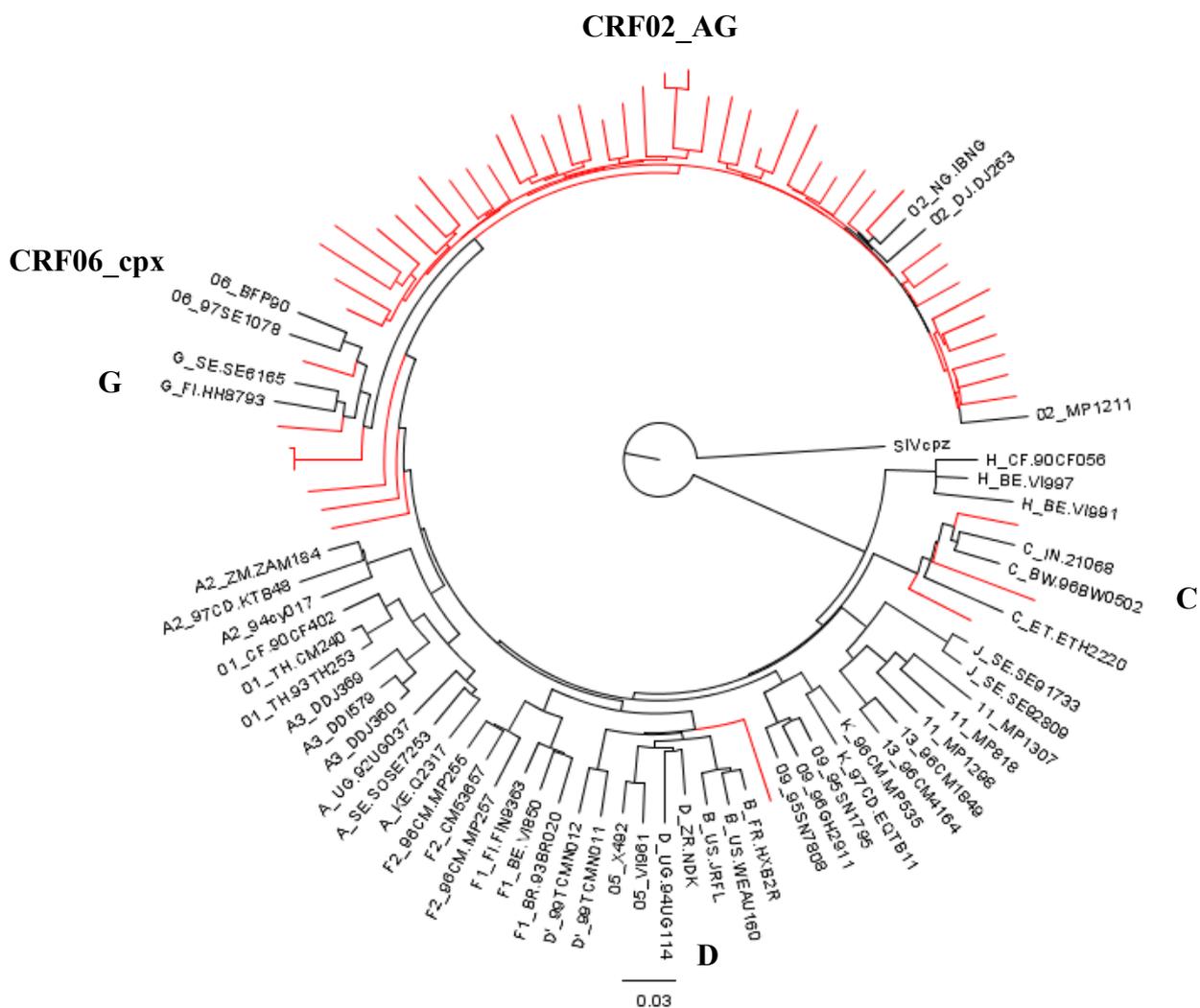
**Figure 29 : Prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.** Mutations aux INNTI observées chez 47 enfants suivis à l'hôpital d'enfants Albert Royer de Dakar, recevant un traitement ARV de première ligne pour une durée médiane de 26 mois, et qui avaient une charge virale plasmatique  $\geq 3.0 \log_{10}$  copies/ml.

#### 4-5 Mutations de résistance aux IP

Aucune mutation majeure conférant une résistance aux IP n'a été détectée.

#### 4-6 Diversité génétique du VIH-1

L'analyse phylogénétique des 52 séquences obtenues, a montré une prédominance du CRF02\_AG avec 39 cas (75 %) (figure 30). Le sous type C était observé dans 3 cas (6%) et le CRF06\_cpx était retrouvé chez 1 enfant (2%). Les sous types D et G étaient retrouvés chacun chez 1 enfant (2%). Des virus recombinants ont aussi été retrouvés: CRF02\_AG/A1 dans 2 cas (4%) et CRF06\_cpx/CRF02\_AG dans 2 cas (4%) aussi. Les recombinants A1/CRF02\_AG, CRF02\_AG/CRF09\_cpx et U/CRF14\_BG ont chacun été retrouvés dans 1 cas (2%). Il n'y avait pas de relation entre les profils de résistance et les sous-types et formes recombinantes.



**Figure 30: Arbre phylogénétique en Neighbor Joining des 52 séquences du gène *pol* sur un alignement de 1010 pb**

En rouge : les souches étudiées

En noir : les souches de référence

#### **4-7 Interprétation des tests de résistance et des futures options thérapeutiques possibles**

Parmi les 48 virus séquencés retrouvés chez les enfants en échec de première ligne de TARV, qui avaient des mutations de résistance, 36 (75%), 38 (79%) et 39 (81%) étaient sensibles à l'ABC, à la ddI et au TDF respectivement. Ces résultats montrent que les INTI recommandés par l'OMS en seconde ligne en Afrique seraient actifs dans la majorité des enfants ( $\geq 75\%$ ) nécessitant un changement thérapeutique. Par contre, l'utilisation des INNTI de première génération était largement compromise chez les enfants en échec de première ligne de TARV, étant donné que 90% d'entre eux avaient des virus résistants à l'EFV et à la NVP. De plus, la résistance à l'étravirine, une nouvelle molécule d'INNTI de deuxième génération, a été observée chez 10 enfants (21%). Les molécules de la classe des IP étaient actives chez tous les enfants en échec de TARV de première ligne.

#### **5- Conclusion**

En conclusion, une prévalence élevée de la résistance aux INTI et aux INNTI a été observée chez les enfants en première ligne de traitement selon les recommandations de l'OMS, étant en EV. Ces informations mettent en évidence le besoin d'améliorer l'adhérence chez les enfants traités et d'assurer un monitoring biologique adéquat avec une détection précoce de l'EV. Par ailleurs, les résultats obtenus mettent en exergue le besoin d'étudier une possible préexistence de mutations de résistance qui seraient archivées durant l'utilisation de molécules ARV dans le cadre de la PTME.

# **Prévention de la transmission mère enfant et résistance du VIH-1 aux INNTI**

**Article 3 (soumis)**

**The case for addressing primary resistance mutations to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors to treat children born from HIV-infected mother in sub-Saharan Africa**

**Khady Kébé, Laurent Bélec, Halimatou Diop Ndiaye, Sokhna Bousso Gueye, Abou Abdalah Malick Diouara, Safiétou Ngom, Ndéye Rama Diagne Gueye, Ngagne Mbaye, Haby Signaté Sy, Souleymane Mboup, Coumba Touré Kane**

## 1-Problématique

En dépit de l'efficacité prouvée de la PTME dans les essais cliniques (Tubiana *Ret al.*, 2010 ; *et al.*, 2009 ; Kesho Bora Study Group, 2010 ; Thior I *et al.*, 2006; Shapiro R L *et al.*, 2010 ; Chasela C S *et al.*, 2010 ; Palombi L *et al.*, 2007 ; Tonwe-Gold B *et al.*, 2007), son utilisation en routine sur le terrain, n'est pas sans inconvénients (Dabis F *et al.*, 2002). Selon les recommandations de l'OMS, la névirapine a été la première molécule utilisée pour la PTME et elle est aujourd'hui incluse dans les autres schémas de prophylaxie. Dans les nouvelles recommandations de l'OMS, il est indiqué de faire une chimioprophylaxie chez les femmes enceintes infectées en utilisant une trithérapie dont deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), tels que l'AZT, la 3TC et la NVP, avant la naissance et après quand la mère allaite, et une combinaison d'AZT et NVP pour les enfants nés de mère séropositive (Organisation Mondiale de la Santé, 2010b). Actuellement ces schémas incluant la NVP restent la pierre angulaire de la chimioprophylaxie pour la TME du VIH-1 dans les pays à ressources limitées (Organisation Mondiale de la Santé, 2010b).

Le problème majeur de l'exposition à la NVP est la sélection rapide de mutations de résistance, en raison de sa faible barrière génétique (Casado J L *et al.*, 2000 ; Conway B *et al.*, 2001 ; Deshpande A *et al.*, 2007), ayant pour conséquences une résistance croisée à la fois à la NVP et à l'éfavirenz, qui font partie des schémas thérapeutiques de première intention dans la plupart des pays à ressources limitées (Arrivé E *et al.*, 2007). Des études antérieures ont rapporté une prévalence élevée de résistance à la NVP chez les nourrissons nés de mères séropositives, atteignant par exemple 40% en Afrique du Sud (Gordon M *et al.*, 2004) et 87% au Malawi (Eshleman S H *et al.*, 2005). Une méta-analyse a estimé que la prévalence de la résistance à la NVP chez les nourrissons de 6 semaines après l'exposition était de 53% (Arrivé E *et al.*, 2007). Ainsi, l'émergence de la résistance aux médicaments antirétroviraux pendant la période de la chimioprophylaxie pour la TME peut ultérieurement compromettre le traitement antirétroviral, et réduire la possibilité de choix d'ARV actifs (DeGruttola V *et al.*, 2000).

## 2-Objectif

L'objectif de la présente étude observationnelle était d'évaluer le taux de résistance chez les enfants infectés verticalement par le VIH et naïfs de trithérapie, y compris ceux ayant reçu de la NVP pour la PTME, et de discuter le risque de survenue d'un échec thérapeutique à la première ligne de TARV recommandée par l'OMS dans les pays à ressources limitées.

## **3-Méthodologie**

### **3-1 Population d'étude**

Des échantillons de sang d'enfants nés de mères infectées par le VIH envoyés au laboratoire central pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH ont été utilisés pour la présente étude en 2011. Aucun enfant n'a été traité par HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) au moment de l'échantillonnage.

Le papier buvard a été le support utilisé pour effectuer les prélèvements qui, une fois au niveau du laboratoire de référence, étaient conservés à -20 ° C jusqu'à la réalisation des tests. Le test Amplicor de Roche HIV-1 DNA v1.5 a été utilisé comme test qualitatif *in vitro* pour la détection de l'ADN du VIH-1 dans le sang total afin de faire le diagnostic de l'infection, comme précédemment décrit (Piwowar-Manning E *et al.*, 2008).

Les critères d'inclusion des enfants étaient les suivants: enfants nés de mères infectées par le VIH-1; dont l'infection par le VIH-1 a été confirmée par le diagnostic virologique; n'ayant pas reçu de trithérapie ARV et dont l'historique de la prévention de la TME était disponible. Les critères d'exclusion étaient un diagnostic de l'infection par le VIH-1 pas formellement établi et le manque d'informations sur la prévention de la TME.

### **3-2 Test de génotypage et algorithmes d'interprétation**

Des analyses de résistance génotypique ont été effectuées. En bref, l'ADN proviral du VIH-1 a été extrait des DBS par la technique NucliSENS (BioMérieux, Lyon, France), amplifié pour obtenir un fragment partiel de la transcriptase inverse du gène *pol* du VIH-1, puis séquencé en utilisant la technique de l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites (ANRS, Paris, France), comme précédemment décrit (Pasquier C *et al.*, 2001). Les profils génotypiques de résistance ont été analysés selon la base de données de l'université de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>) et le groupe ANRS-AC11 (<http://www.hivfrenchresistance.org/>, version22).

### **3-3 Analyses statistiques**

Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les proportions, par le logiciel Graph Pad Prism version 5.00.

## **4- Résultats**

### **4-1 Population d'étude**

Un total de 25 cartes de DBS issues d'enfants verticalement infectés par le VIH-1 et naïfs de trithérapie ARV a été obtenu pour l'étude. L'âge médian était de 5,5 mois (1,5-17 mois), et 16 étaient de sexe masculin. L'allaitement maternel était effectué par 15 parmi les 25 (60%) mères.

Treize enfants ont été infectés en dépit d'une PTME par une prophylaxie basée sur la NVP. Les mères avaient reçu des combinaisons de médicaments ARV y compris la NVP, pour la prophylaxie. La combinaison principale (67%) était AZT + 3TC + NVP (tableau IX). Les nourrissons avaient reçu une dose unique de NVP ou une dose unique de NVP + 1 semaine d'AZT. Les douze autres enfants infectés n'avaient pas bénéficié de PTME.

### **4-2 Profils génotypiques de résistance**

Des mutations de résistance aux ARV ont été détectées chez 8 (32%) enfants parmi les 25 composant l'étude (tableau IX). Les mutations conférant la résistance aux INNTI étaient présentes chez tous les enfants (100%) qui avaient une résistance. Les mutations concernées étaient K103N à 43%, Y181C, K101E et V106M chacun à 29%, et Y188L à 14%. Par ailleurs, la D67N a été observée chez seulement deux enfants dont les mères avaient reçu une prophylaxie pour la prévention de la transmission mère-enfant du VIH-1. Un seul enfant (8%) né sans PTME avait des virus porteurs de la mutation de résistance aux INNTI K101E. Le nombre moyen de mutations de résistance aux INNTI été plus élevée dans le groupe des enfants dont les mères avaient reçu une prophylaxie à la NVP que dans celui des enfants pour qui il n'y a pas eu de PTME [13 mutations chez les treize enfants (ce qui faisait une moyenne de 1 mutation par enfant) par rapport à 1 mutation chez 12 enfants (ce qui faisait une moyenne de 0,08 mutation par enfant);  $p < 0,001$ ]. La sélection de TAM chez les enfants non traités pouvait être observée chez 2 des 12 (16%) couples mère-enfant ayant reçu de l'AZT pour la chimioprophylaxie de la TME. Il n'y avait pas de différence significative entre les nombres moyens de TAM observées dans les deux groupes [2 mutations chez 13 enfants (ce qui faisait une moyenne de 0,15 mutation par enfant) contre 0 mutation chez 12 enfants,  $p > 0,05$ ]. La proportion d'enfants qui avaient des virus résistants était 6,5 fois plus élevée chez ceux appartenant à des couples mère-enfant ayant reçu une chimioprophylaxie par rapport à ceux n'ayant pas reçu de prophylaxie [7 sur 13 (53,8%) contre 1 sur 12 (8,3%),  $p \leq 0,03$ ].

**Tableau IX : Tableau récapitulatif des mutations de résistance concernant les 25 enfants**

Enfant	Age (mois)	Prophylaxie mère	Prophylaxie enfant	Mutations de résistance aux INNTI	Mutations de résistance aux INTI
#4569	3	AZT-3TC-NVP	AZT-NVP	<b>K103N</b>	<b>D67N</b>
#4001	8	AZT-3TC-NVP	Non	<b>V90I, Y188L</b>	-
#7078	3	AZT-3TC-NVP	NVP	<b>K103N, Y181C</b>	-
#5254	1,5	AZT-NVP	AZT-NVP	<b>K101E, V106M</b>	-
#6118	4	AZT-3TC-NVP	AZT-NVP	<b>K101E, V106M, P225S</b>	<b>D67N</b>
#5237	8	D4T-3TC-NVP	AZT-NVP	<b>Y181C, H221Y</b>	-
#7405	3	Non	NVP	<b>K103N</b>	-
#3994	3	NVP	AZT-NVP	-	-
#7225	1,5	AZT-3TC-NVP	NVP	-	-
#5222	12	AZT-3TC-NVP	AZT-NVP	-	-
#7041	1,5	AZT-3TC-NVP	No	-	-
#6179	5	AZT-3TC-NVP	No	-	-
#6453	5	D4T-3TC-NVP	AZT-NVP	-	-
#3988	3	Non	Non	-	-
#7278	8	Non	Non	-	-
#7137	3	Non	Non	-	-
#7399	1,5	Non	Non	-	-
#7561	4	Non	Non	-	-
#5947	8	Non	Non	<b>K101E</b>	-
#6250	3	Non	Non	-	-
#6467	3	Non	Non	-	-
#6048	1,5	Non	Non	-	-
#6546	12	Non	Non	-	-
#6028	1,5	Non	Non	-	-
#5687	5	Non	Non	-	-

## 5- Conclusion

En conclusion, un taux élevé de mutations de résistance aux INNTI a été trouvé dans la présente série d'enfants vivant au Sénégal et âgés de moins de 13 mois, probablement à cause de l'utilisation systématique de la NVP dans l'achimioprophytaxie pour lutter contre la TME du VIH. Ces résultats ont permis de mettre en exergue le besoin essentiel d'un diagnostic précoce de l'échec thérapeutique par un suivi biologique optimal des jeunes enfants traités par des médicaments antirétroviraux, selon les recommandations de l'OMS, et de rendre disponibles des traitements plus efficaces pour les nourrissons pré-exposés à la NVP dans les pays à ressources limitées.

# **Discussion**

# Discussion

L'infection à VIH pédiatrique pose un réel problème de prise en charge tant au plan du diagnostic néonatal que du suivi de la résistance aux ARV. Ainsi, ces deux volets concernant le suivi virologique de l'infection ont été abordés.

Les résultats de notre travail portant sur l'évaluation du NucliSENS ont permis de trouver une sensibilité et une spécificité de 100% pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH aussi bien sur des prélèvements de sang total sur tube EDTA que sur DBS. Ce travail a montré que les techniques ARN pouvaient bien être utilisées dans le cadre du diagnostic néonatal de l'infection à VIH, et en plus le NucliSENS dédié à la quantification donne aussi une idée sur le niveau de répllication virale. C'est une plateforme qui est simple, facile à implémenter et dont la réalisation d'une analyse est relativement courte (4 heures), particulièrement l'extraction, par rapport aux autres kits commerciaux notamment la technique Amplicor (Stevens W *et al.*, 2004). La technique ADN de Amplicor est la référence pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH-1 et sa performance sur DBS et sang total sur tube a été validé au cours de plusieurs études dans des pays Nord et Sud (Sherman G G *et al.*, 2005). En Thaïlande, où le recombinant CFR01\_AE est prédominant (Leelawiwat W *et al.*, 2009), les recherches ont montré que la sensibilité du Amplicor avec les prélèvements de sang total sur tube augmentait de 40% à la naissance à 100% à l'âge de 2 mois, et sa spécificité était de 100% quelque soit l'âge. Des études menées aux Etats Unis ont comparé l'utilisation de l'ADN proviral et de l'ARN pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH. La sensibilité de ces tests variait selon l'âge. Chez les enfants de moins de 3 semaines de vie, des valeurs de sensibilité de 27% pour l'ADN, 64% pour le test quantitatif ARN et 55% pour les tests qualitatifs ont été trouvés. Ces mêmes tests avaient une sensibilité de 96,2% chez les enfants âgés de 4 à 6 semaines et de 100% pour ceux de plus de 7 mois de vie. La spécificité de la PCR ADN pour tous ces groupes d'âge était de 100%, alors que celle des tests quantitatives et qualitatives ARN étaient de 95,5 et 96,1% (Cunningham, C K *et al.*, 1999).

Les charges virales très élevées chez les enfants infectés, confirment les résultats des autres études qui ont fait état d'une détection de charge virale chez les enfants (Creek T L *et al.*, 2007 ; Cunningham C *et al.*, 1999 ; Leelawiwat W *et al.*, 2009 ; Lilian R R *et al.*, 2010 ; Lofgren S M *et al.*, 2009). A cause de cette charge virale souvent élevée chez les enfants, nous avons recommandé une valeur seuil de 5000UI/ml, pour interpréter la positivité au VIH-1, et nous considérons que pour une valeur inférieure à ce seuil le test devrait être répété pour

éviter les faux positifs. En définitive, le NucliSENS a une bonne performance pour la détection du VIH-1 chez les enfants. C'est grâce à une identification précoce de l'infection que le traitement ARV va pouvoir être mis en route.

Ce traitement ARV rencontre beaucoup de difficultés en pédiatrie, et dans la cohorte d'enfants sous TARV, qui a fait l'objet d'une évaluation virologique, plus de la moitié des patients étaient en EV selon les critères de l'OMS datant de 2010. La durée médiane de traitement chez ces patients, était de 20 mois. En plus, 92% des enfants en EV avaient sélectionné des virus qui comportaient des mutations de résistance, et 17% d'entre eux avaient au moins une mutation de résistance aux INTI ou aux INNTI après avoir exclu la M184V. Le taux d'EV (56%) dans cette série était plus élevé que ceux rapportés en Ouganda (13%-26%) (Ruel T D *et al.*, 2011 ; Kanya M R *et al.*, 2007), en Afrique du Sud (44%) (Germanaud D *et al.*, 2010) et au Cambodge (19%) (Janssens B *et al.*, 2007), mais était similaire à celui précédemment rapporté en Bangui en République Centre Africaine après 6 mois de TARV (Gody J C *et al.*, 2008).

Trois enfants qui avaient une résistance aux ARV, avaient une charge virale comprise entre 3 et 3,7 log<sub>10</sub> copies/ml, montrant ainsi que l'échec thérapeutique pourrait être sous diagnostiqué en utilisant les critères de l'OMS datant de 2010 (charge virale  $\geq 3,7$  log<sub>10</sub> copies/ml) (Organisation mondiale de la santé, 2010).

La majorité des virus isolés de patients en EV comportaient des mutations de résistance aux INTI et aux INNTI. Des prévalences de résistance élevées similaires à celles que nous avons trouvées ont aussi été rapportées dans d'autres pays (Tableau X). Dans ces études, les enfants étaient exposés aux INTI et le taux de résistance à cette classe variait de 59% à 100%. La résistance aux INNTI allait de 26% à 100%. En Côte d'Ivoire où les IP ont été utilisés à plus de 70%, un taux d'environ 40% de résistance à cette classe a été retrouvé.

**Tableau X: Prévalence de la résistance chez les enfants en échec virologique sous première ligne de traitement ARV dans des pays à ressources limitées.**

Pays	Nombre de patients	Age médian (années)	TARV		Médiane de suivi (mois)	Seuil de l'échec virologique (copies/ml)	Prévalence de la résistance			
			INNTI (%)	IP (%)			Au moins une mutation (%)	INTI (%)	INNTI (%)	IP (%)
Cameroun (Fokam J <i>et al.</i> , 2011)	51	6	80	na	20	≥1000	90	90	86	8
Centre Afrique (Charpentier C <i>et al.</i> , 2012)	59	8	76	5	>18	≥5000	85	83	85	0
Chine (Zhang F <i>et al.</i> , 2009)	76	13,9	100	0	33	>1000	100	≥83	≥98	0
Côte d'Ivoire (Chaix M L <i>et al.</i> , 2005)	38	6	26	74	10	≥1000	71	59	26	41
Malaisie (Mohamad S <i>et al.</i> , 2012)	18	na	78	22	24	≥1000	94	≥67	≥56	6
Ouganda (Towler W I <i>et al.</i> , 2010)	12	12	100	0	11	≥1000	100	100	100	8
Afrique du Sud (Green T N <i>et al.</i> , 2012)	41	8	81	19	29	-	85	≥71	≥78	2
Thaïlande (Jittamala P <i>et al.</i> , 2009)	39	8	100	0	6	≥1000	≥97	89	97	na
Thaïlande (Puthanakit T <i>et al.</i> , 2010)	120	9	100	0	24	≥1000	≥98	≥85	98	na
Zambie (Gupta R K <i>et al.</i> , 2010)	26	na	100	0	Entre 12 et 33	≥1000	≥96	≥84	96	na
Sénégal (Kebe K <i>et al.</i> , 2013)	52	7	100	0	26	≥1000	92	88	99	0

na : non applicable

Dans notre étude, la distribution des sous types du VIH-1 est similaire à celle retrouvée chez les adultes au Sénégal (Vergne L *et al.*, 2003), avec une prédominance du CRF02\_AG. Il n'y a pas eu d'évidence de relation entre les profils de mutations de résistance et les sous types du VIH-1. Ces informations ont montré que dans notre contexte, la sélection des mutations de résistance ne semble pas être influencée par la diversité génétique (Montes B *et al.*, 2004 ; Chaix M L *et al.*, 2005).

La mutation M184V/I était la mutation de résistance aux INTI la plus observée (95%), probablement à cause de l'utilisation systématique de la 3TC qui est une molécule à faible barrière génétique (Schuurman R *et al.*, 1995 ; Zaccarelli M *et al.*, 2003), dans les schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS pour la prise en charge du SIDA pédiatrique au niveau des pays à ressources limitées (Organisation mondiale de la santé,

2006 ; Organisation mondiale de la santé, 2010). Selon les directives de l’OMS, la présence de la M184V qui confère la résistance croisée à 3TC et FTC, n’empêche pas l’utilisation de ces molécules en deuxième ligne de traitement. En plus, l’utilisation de la 3TC/FTC en deuxième ligne est même bénéfique, à cause de la diminution du fitness viral des VIH-1 mutés au codon 184 (Turner D *et al.*, 2004 ; Paredes R *et al.*, 2009). Cependant l’impact effectif *in vivo* de la mutation de résistance M184V chez les enfants recevant une seconde ligne de TARV devrait être étudié dans les cohortes pédiatriques africaines. Par ailleurs, chez les adultes infectés par les sous types B du VIH-1, il a été démontré que la M184V retardait l’émergence de TAM (Ait-Khaled M *et al.*, 2002 ; Ait-Khaled M *et al.*, 2008), suggérant ainsi qu’il serait avantageux de maintenir la 3TC même chez les patients ayant une charge virale détectable (Ait-Khaled M *et al.*, 2002). Dans notre étude, les TAM ont été retrouvées chez plus d’un tiers (40%) des enfants ayant des virus résistants aux INTI, probablement à cause de l’utilisation massive de l’AZT dans les schémas pédiatriques de première ligne recommandés par l’OMS (Organisation mondiale de la santé, 2007 ; Organisation mondiale de la santé, 2010). La relative proportion moyenne (40%) de TAM chez ces enfants en échec thérapeutique serait en partie expliquée par la haute fréquence de la mutation M184V, conférant une augmentation de la sensibilité à l’AZT et au d4T, participant ainsi à la moyenne fréquence des TAM (Boyer P L *et al.*, 2002 ; Ait-Khaled M *et al.*, 2002). Cette prévalence moyenne des TAM permet de maintenir la sensibilité au TDF, dont la résistance nécessite une accumulation d’au moins trois TAM (Masquelier B *et al.*, 2004). Presque tous les enfants (99%) ayant des virus résistants, avaient une résistance aux INNTI. Ce profil de résistance est la conséquence de l’utilisation systématique de la NVP et de l’EFV, deux molécules à barrière génétique faible aussi (Bachelier L *et al.*, 2001 ; Casado J L *et al.*, 2000), ou à une précédente sélection de mutations de résistance aux INNTI chez les mères ayant reçu une prophylaxie pour la PTME (Arrivé E *et al.*, 2007). Dans cette série, les ARV de seconde ligne recommandés par l’OMS en 2010, étaient toujours efficaces en cas d’EV, avec une activité prédictive de l’ABC, de la ddI et du TDF dans 75%, 79%, et 93% des cas respectivement.

L’adhérence au TARV continue d’être un problème majeur de prise en charge des enfants infectés par le VIH (Haberer J E *et al.*, 2011). Dans notre étude, la fréquence d’interruption de traitement était plus élevée chez les enfants en EV que chez ceux qui avaient une charge virale indétectable. Ces interruptions de traitement entraînent un problème d’observance qui constitue un facteur crucial dans l’efficacité des ARV. Certains enfants qui étaient en EV avaient des virus résistants, malgré l’absence d’interruption de traitement selon

les enregistrements de la pharmacie. Cette observation suggère la possibilité d'une infection par une souche résistante. En effet, la résistance du VIH aux ARV chez les enfants naïfs de traitement a été précédemment rapportée dans des pays d'Afrique subsaharienne où la NVP en dose unique était largement utilisée dans la PTME (vanZyl G U *et al.*, 2010 ; Charpentier C *et al.*, 2011). En plus, même avec une assiduité à la pharmacie, une mauvaise adhérence à la maison peut entraîner un échec thérapeutique.

Des virus sensibles aux classes majeures d'ARV ont été retrouvés chez 8% des enfants recevant une première ligne et étant en échec virologique. Cet EV associé à des virus sensibles est dû à une mauvaise adhérence, qui nécessite une correction en urgence. L'adhérence chez les enfants a été trouvée inversement associée à une charge virale élevée après 6 mois de thérapie (Gody J C *et al.*, 2008). Le monitoring virologique est un vrai challenge chez les enfants infectés par le VIH, qui ont très souvent des difficultés dans le maintien d'une bonne adhérence.

Dans notre étude, 45 enfants (94%) parmi les 48 ayant des virus résistants aux INNTI avaient besoin de deuxième ligne comprenant un IP étant donné qu'aussi bien la NVP que l'EFV ne pouvaient être utilisés. Selon l'interprétation des résultats de génotypage effectuée en utilisant la base de données de l'université de Stanford, l'efficacité de l'ETR était compromise chez 21% des enfants, comme précédemment rapporté en Bangui (Charpentier C *et al.*, 2012). Cette prévalence est plus élevée que celles (2,4 – 3,8) rapportées dans les pays développés (Cotte L *et al.*, 2009 ; Scherrer A U *et al.*, 2009). Dans cette étude, la résistance primaire à l'ETR reflète une possible spécificité génétique des souches non-B (Maïga A I *et al.*, 2010), en plus d'une répllication virale sous première ligne, pendant de longues durées. Le lopinavir boosté avec le ritonavir pouvait encore être utilisé en seconde ligne.

La question soulevée dans cette étude et relative à la préexistence de la résistance en pédiatrie, c'est-à-dire avant initiation de la trithérapie, a motivée la seconde étude de résistance que nous avons menée chez des enfants naïfs de trithérapie. Dans cette étude observationnelle, la prévalence de la résistance du VIH-1 aux ITI est de 32% chez les enfants de moins de 13 mois d'âge, naïfs de trithérapie ARV et infectés de façon verticale. Ce taux de résistance trouvé pourrait même être sous-estimé chez ces enfants car les variantes résistantes minoritaires ne peuvent pas être détectés par le génotypage standard classique (Lecossier D *et al.*, 2005 ; Metzner K J *et al.*, 2005). Néanmoins, nos observations reflètent les conséquences de l'utilisation massive de la NVP dans la PTME au Sénégal. Les enfants naïfs de HAART peuvent être infectés par des souches de VIH résistantes. Cette résistance primaire dans la

population pédiatrique est associée à des pratiques antérieures de la chimioprophylaxie pour une PTME (van Zyl G U *et al.*, 2010 ; Charpentier C *et al.*, 2011). Notre étude a permis de montrer clairement que la proportion (53,8%) des enfants non traités infectés par le VIH et dont les virus hébergeaient des mutations de résistance était beaucoup plus (6,5 fois) élevée lorsque la chimioprophylaxie pour la transmission mère-enfant était reçue. Ces résultats sont cohérents avec celles des études antérieures menées en Afrique, et qui rapportent que l'acquisition du VIH-1 de façon verticale était fréquemment associée à une résistance à la NVP et une résistance croisée aux INNTI chez les enfants pré-exposés à cette molécule durant la PTME (Arrivé E *et al.*, 2007 ; Zeh C *et al.*, 2011). La sélection de TAM chez les enfants de l'étude était faible malgré l'utilisation fréquente de l'AZT dans la chimioprophylaxie chez les mères ou les enfants, ce qui confirme que la pression de sélection de cet INTI est nettement moins puissante que celle des INNTI quand il est utilisé dans la prévention de la transmission mère-enfant (Zeh C *et al.*, 2011).

Les conséquences négatives de la résistance acquise au cours de la chimioprophylaxie de la transmission mère-enfant sont particulièrement importantes dans la population pédiatrique, puisque le nombre de médicaments antirétroviraux disponibles pour un usage pédiatrique est très réduit dans les pays à ressources limitées. En outre, en raison de la longue durée du traitement antirétroviral chez les enfants infectés, la prévention de l'apparition de résistances est essentielle afin de préserver les futures options thérapeutiques. La prévalence élevée de la résistance primaire observée dans la présente série de nouveaux nés infectés par le VIH-1 au Sénégal a d'importantes implications thérapeutiques concernant le choix des médicaments de première intention chez l'enfant né de mère infectée par le VIH et ayant reçu de la NVP pour la PTME. En effet, l'utilisation de la NVP dans le traitement de première ligne chez les enfants de l'étude serait associée à un échec virologique rapide de près d'un tiers d'entre eux (32%) en raison de la préexistence de variantes résistantes aux INNTI. Les observations effectuées dans notre première étude de résistance et qui faisaient état d'un taux d'échec virologique élevé associé à la sélection de mutations de résistance chez des enfants sénégalais qui recevaient la première ligne de traitement ARV comprenant des INNTI (Kebe K *et al.*, 2013), sont compatibles avec cette dernière hypothèse. Ces résultats renforcent fortement la nécessité d'éviter les INNTI de première génération et plutôt d'utiliser des combinaisons incluant des inhibiteurs de la protéase en première ligne chez les enfants ayant reçu ces INNTI pour la prévention de la TME, en accord avec les recommandations de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, 2010b). En définitive, la sélection de mutations associées à la

résistance aux INNTI chez des enfants sénégalais infectés par le VIH-1 sous traitement de première ligne est probablement liée à la préexistence des souches virales hébergeant des mutations acquises au cours de la PTME, en plus des autres facteurs additionnels tels qu'une mauvaise observance.

Malgré la taille réduite de l'échantillon de la présente série, ces résultats suggèrent qu'au Sénégal, la prévalence de la résistance primaire serait substantielle au niveau de la population pédiatrique de moins de 18 mois. Quelques rares études de résistance chez les enfants verticalement infectés par le VIH-1 et vivant dans les pays à ressources limitées ont montré une prévalence modérée de 5,4% à Maputo, au Mozambique (Vaz P *et al.*, 2012), 6,3% en Afrique du Sud (van Zyl G U *et al.*, 2010), 7,6% au Vietnam (Trinh Q D *et al.*, 2012), 9,8% au Brésil (Ferreira F G *et al.*, 2010) et 13,9% en République centrafricaine (Charpentier C *et al.*, 2011). Bien que les tests de résistance génotypique ne soient pas toujours effectués en routine au Sénégal, nos observations soulignent la nécessité de surveiller les enfants recevant la première ligne par la détermination de la charge virale plasmatique afin de mettre en évidence le plus tôt possible les situations d'échec virologique et ou thérapeutique et ainsi pouvoir changer le traitement à temps. En outre, l'évaluation de la résistance primaire dans la population pédiatrique doit constituer une priorité au Sénégal, comme l'a récemment recommandé l'OMS (Bertagnolio S *et al.*, 2012).

# **Conclusion Générale et Perspectives**

# Conclusion générale et perspectives

En 2011, 330 000 enfants ont été infectés par le VIH et 90% d'entre eux vivaient en Afrique subsaharienne. Face aux problèmes liés à cette pandémie en pédiatrie, la communauté internationale s'est aujourd'hui engagée à déployer d'énormes efforts pour mettre fin à de nouvelles infections chez les enfants. C'est dans ce sens que l'ONUSIDA a fait de l'élimination de la transmission verticale du VIH, l'un des points du troisième objectif spécifique relatif à la déclaration politique des Nations Unies sur le VIH/SIDA, effectuée en 2011 (ONUSIDA 2012). Chez les enfants qui sont infectés, le traitement ARV a considérablement réduit la morbidité et la mortalité (Gortmaker S L *et al.*, 2001 ; de Martino M *et al.*, 2000 ; Sanchez J M *et al.*, 2003). En vue des nouvelles recommandations, qui veulent que tous les enfants de moins de 24 mois soient mis sous ARV quel que soit le stade clinique ou immunologique (Organisation Mondiale de la Santé, 2010a), la prise des ARV va donc augmenter. Mais en pédiatrie, la prise en charge des enfants infectés par le VIH reste difficile, surtout dans les pays à ressources limitées, à cause du retard dans le diagnostic néonatal, le manque de formulations pédiatriques des ARV, le défaut d'observance, l'émergence de la résistance.

Deux grandes thématiques d'aspect virologique ont été abordées dans notre travail. Il s'agit du diagnostic néonatal de l'infection à VIH et de la résistance aux ARV chez les enfants.

L'importance de débiter le TARV à un stade précoce de la vie de l'enfant infecté, est aujourd'hui bien documentée. Pour rendre cela possible, il est nécessaire de faire un diagnostic qui permettra de confirmer ou d'infirmer une infection. Il est de ce fait crucial de disposer d'outils de diagnostic adéquats. La technique de référence Amplicor basée sur une détection de l'ADN proviral comporte plusieurs étapes manuelles et dure environ 6 heures. Les plateformes automatisées basées sur la détection de l'ARN viral, existant au laboratoire de référence n'étaient utilisées que pour la détermination de la charge virale plasmatique dans le cadre du suivi des patients sous TARV. Ces plateformes sont simples à utiliser et le résultat de l'analyse peut être obtenu en un temps très court. C'est dans ce sens que l'évaluation du NucliSENS qui est une technique permettant de détecter l'ARN du virus, a été entreprise et a permis de montrer sa sensibilité et sa spécificité lorsqu'on le compare à la technique de référence Amplicor. Le NucliSENS a une sensibilité de 100% et une spécificité de 100%. Sa valeur prédictive positive est de 100% et sa valeur prédictive négative est de 100%. Il

représente un outil alternatif pour le diagnostic de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois de vie.

Dans le cadre de la prévention de la transmission verticale du VIH, le gouvernement du Sénégal avait procédé à un passage à l'échelle après avoir débuté par une phase pilote. Aujourd'hui il s'est engagé aux côtés de tous les acteurs de la riposte au Sida et de la Santé de la Reproduction pour relever le défi de l'élimination de la TME du VIH en 2015. Cela a entraîné une augmentation des sites de PTME à travers tout le territoire national. Mais il n'y a pas eu de décentralisation du diagnostic néonatal en dépit de cette multiplication de sites de PTME. Il est de ce fait urgent d'entreprendre cette décentralisation à grande échelle, pour permettre une disponibilité de ce test au niveau de plusieurs sites reculés dans le pays. Les travaux que nous avons effectués sur le diagnostic néonatal ont montré que le NucliSENS constitue une bonne plateforme qui peut être utilisée pour ce test, et reste adéquat pour une utilisation dans des zones différentes du centre de référence, où les laboratoires ne disposent pas toujours de plateau technique nécessaire pour la biologie moléculaire.

Ce diagnostic précoce permet aux enfants d'avoir accès au traitement, apporte une certaine assurance aux familles des enfants non infectés et aide les programmes de PTME dans l'évaluation de leur efficacité. Cette thérapeutique antirétrovirale peut être entravée par l'émergence de mutations de résistance.

Le deuxième volet de notre travail a concerné cette résistance du VIH-1 en pédiatrie. Comme précédemment décrit, l'utilisation des ARV est associée à des complications telles que la perte de sensibilité du virus vis-à-vis de ces molécules. Cette résistance peut être observée aussi bien chez les enfants sous trithérapie ARV que chez ceux qui en sont naïfs.

Pour connaître la prévalence de la résistance du VIH-1 chez les enfants sous trithérapie, nous avons effectué une étude transversale chez des patients de moins de 15 ans suivis à l'hôpital Albert Royer qui est le centre de référence en matière de prise en charge du SIDA pédiatrique au Sénégal. Un nombre total de 125 enfants qui avaient au moins 6 mois de traitement de première ligne, ont été inclus dans notre étude. Une détermination de la charge virale a été effectuée par la plateforme m2000 des laboratoires Abbott et le test de génotypage fait par la technique de l'ANRS. Plus de la moitié des enfants sous TARV, étaient en EV selon les critères de l'OMS datant de 2010. La durée médiane de traitement chez ces patients, était de 20 mois. Chez ces enfants en EV, 92% avaient des virus qui comportaient des mutations de résistance aux ARV. La résistance aux INTI était de 88%. La mutation M184V/I était la mutation de résistance aux INTI la plus observée (95%), probablement à

cause de l'utilisation systématique de la 3TC (Schuurman R *et al.*, 1995 ; Zaccarelli M *et al.*, 2003), dans les schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS pour la prise en charge du SIDA pédiatrique dans les pays à ressources limitées (Organisation mondiale de la santé, 2007 ; Organisation mondiale de la santé, 2010). Chez les enfants qui avaient une résistance aux ARV, 99% avaient des virus résistants aux INNTI. Ce profil de résistance est dû à l'utilisation massive de la NVP et de l'EFV, deux molécules ayant une barrière génétique faible (Bachelier L *et al.*, 2001 ; Casado J L *et al.*, 2000), ou à une précédente sélection de mutations de résistance durant la PTME (Arrivé E *et al.*, 2007).

Cette évaluation virologique du traitement ARV effectuée dans une structure de référence devra être envisagée dans des cohortes pédiatriques étant en milieu décentralisé.

D'après les profils de mutations de résistance observés, l'efficacité des ARV de seconde ligne recommandés par l'OMS en 2010, en cas d'échec de la première ligne, est encore bonne, avec une activité prédictive de l'ABC, de la ddI et du TDF dans 75%, 79%, et 93% des cas respectivement. Cependant, étant donné les problèmes d'observance souvent observés chez les enfants, il est crucial de mener des études d'évaluation immuno-virologique chez ces patients, pour permettre de connaître le niveau de résistance aux molécules de deuxième ligne et d'attirer l'attention sur une éventuelle nécessité de mise à disposition des troisièmes lignes de traitement ARV en pédiatrie.

Les résultats de nos travaux ont montré que le risque d'échec thérapeutique chez les enfants sous TARV est élevé, même dans les pays où la prise en charge des adultes vivant avec le VIH est associée à de bons taux de succès thérapeutique, comme le Sénégal (Vergne L *et al.*, 2003). Le traitement de l'infection à VIH pédiatrique reste difficile à gérer, à cause de plusieurs facteurs : ceux liés aux médicaments (nombre limité de formulations pédiatriques, dosage complexe des ARV), ceux liés au système de santé (ruptures de médicaments, posologies ou combinaison inappropriées, manque de dispositifs d'aide à l'observance) et ceux liés au patient lui-même (manque d'adhérence). Toutes ces observations rendent la suppression virale plus difficile à obtenir chez les enfants (van Rossum A M *et al.*, 2002 ; Gody J C *et al.*, 2008).

Trois enfants qui avaient une résistance aux ARV, avaient une charge virale comprise entre 3 et 3,7 log<sub>10</sub> copies/ml, montrant ainsi que l'échec thérapeutique pourrait être sous diagnostiqué en utilisant les nouvelles critères de l'OMS datant de 2010 (charge virale ≥3,7 log<sub>10</sub> copies/ml).

Le taux de résistance aux INNTI élevé, observé chez les enfants en échec virologique de première ligne pouvait être une conséquence de l'archivage de mutations de résistance durant la PTME. Cela a été à l'origine de la seconde étude de résistance que nous avons effectuée. Celle-ci a été menée chez des enfants verticalement infectés par le VIH-1, âgés de moins de 13 mois et n'étant pas encore sous trithérapie ARV. Vingt cinq nouveaux nés ont constitué la population d'étude. Ils étaient nés de mères séropositives et avaient un âge médian de 5,5 mois (1,5-17 mois). Treize enfants ont été infectés en dépit d'une PTME par une prophylaxie basée sur la NVP. Les mères avaient reçu des combinaisons de médicaments ARV y compris la NVP, pour la prophylaxie. La combinaison principale (67%) était AZT + 3TC + NVP. Les nourrissons avaient reçu une dose unique de NVP ou une dose unique de NVP + 1 semaine d'AZT. Les douze autres enfants n'avaient pas bénéficié de PTME. Les résultats du génotypage de la TI effectué chez les 25 enfants, ont permis de trouver une prévalence de la résistance égale à 32%. Des mutations de résistance aux INNTI ont été retrouvées chez tous les enfants qui avaient des virus résistants : K103N chez 43%, Y181C, K101E et V106M chez 29% chaque, et Y188L chez 14%. La mutation D67N a été observée uniquement chez deux enfants dont les mères avaient reçu une chimioprophylaxie pour la TME. La proportion d'enfants qui avaient des virus résistants était 6,5 fois plus élevée chez les enfants dont le couple mère-enfant avait reçu une chimioprophylaxie que chez les autres couples sans chimioprophylaxie [7 sur 13 (53.8%) contre 1 sur 12 (8.3%)]. Ces résultats mettent en exergue la nécessité de prendre en compte une possible pré existence de la résistance en cas d'échec virologique chez les jeunes enfants mis sous trithérapie, et le besoin de rendre disponible plus de schémas thérapeutiques pour les enfants infectés et pré exposés à la névirapine durant la PTME. Cette étude pilote effectuée sur la résistance chez les nouveaux nés naïfs de trithérapie ARV a permis de montrer son existence chez ces patients. Avec les nouvelles recommandations de l'OMS en matière de prophylaxie pour la TME, il s'avère crucial de mener une étude nationale de surveillance de la résistance chez ce type de nouveau né, en appliquant le récent protocole défini en 2012 à cet effet. Le papier buvard comme support de prélèvement serait d'un grand apport dans cette surveillance. Les résultats de génotypage permettront non seulement d'avoir une idée sur la prévalence de cette résistance primaire mais aussi de fournir des renseignements de grande importance pour aider à sélectionner de façon optimale un schéma thérapeutique.

En pédiatrie, l'infection à VIH demeure encore problématique, à cause des difficultés rencontrées, telles que le diagnostic néonatal tardif, le manque de formulations pédiatriques

des ARV, le défaut d'adhérence, l'émergence de la résistance. Ces contraintes rendent la prise en charge difficile, d'où la nécessité de renforcer le suivi virologique spécialement dans un contexte où les ressources sont limitées, et où la disponibilité de médicaments ARV abordables est réduite.

# Références

## Références

1. **Abuzaitoun OR, Hanson IC.** Organ-specific manifestations of HIV disease in children. *Pediatric clinics of North America.* 2000;47(1):109-25.
2. **Adamson CS.** Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Molecular biology international.* 2012;2012:604261.
3. **Adje-Toure C, Hanson DL, Talla-Nzussouo N, Borget MY, Kouadio LY, Tossou O, et al.** Virologic and immunologic response to antiretroviral therapy and predictors of HIV type 1 drug resistance in children receiving treatment in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS research and human retroviruses.* 2008;24(7):911-7.
4. **Aghokeng AF, Ayouba A, Mpoudi-Ngole E, Loul S, Liegeois F, Delaporte E, et al.** Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2010;10(3):386-96.
5. **Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Dimodi H, Atem-Tambe A, Tongo M, Butel C, et al.** Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon. *PloS one.* 2009;4(11):e7702.
6. **Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, Cutrell A, Fischl MA, Clumeck N, et al.** Mutations in HIV-1 reverse transcriptase during therapy with abacavir, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected adults with no prior antiretroviral therapy. *Antiviral therapy.* 2002;7(1):43-51.
7. **Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, Stone C, Richards N, Thomas D, et al.** HIV-1 reverse transcriptase and protease resistance mutations selected during 16-72 weeks of therapy in isolates from antiretroviral therapy-experienced patients receiving abacavir/efavirenz/amprenavir in the CNA2007 study. *Antiviral therapy.* 2003;8(2):111-20. Epub 2003/05/14.
8. **Ait-Khaled M, Stone C, Amphlett G, Clotet B, Staszewski S, Katlama C, et al.** M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. *AIDS.* 2002;16(12):1686-9. Epub 2002/08/13.
9. **Andersen ES, Contera SA, Knudsen B, Damgaard CK, Besenbacher F, Kjems J.** Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(21):22243-9.
10. **Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V.** HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Experimental and molecular pathology.* 2008;85(1):2-10.
11. **Apolloni A, Hooker CW, Mak J, Harrich D.** Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication. *Journal of virology.* 2003;77(18):9912-21.

12. **Apolloni A, Meredith LW, Suhrbier A, Kiernan R, Harrich D.** The HIV-1 Tat protein stimulates reverse transcription in vitro. *Current HIV research.* 2007;5(5):473-83.
13. **Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, Van Marck H, Cento V, D'Arrigo R, et al.** Study of genotypic and phenotypic HIV-1 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: a refined analysis by ultra-deep 454 pyrosequencing. *The Journal of infectious diseases.* 2012;205(4):557-67.
14. **Arrive E, Newell ML, Ekouevi DK, Chaix ML, Thiebaut R, Masquelier B, et al.** Prevalence of resistance to nevirapine in mothers and children after single-dose exposure to prevent vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis. *International journal of epidemiology.* 2007;36(5):1009-21.
15. **Ashish, Garg R, Anguita J, Krueger JK.** Binding of full-length HIV-1 gp120 to CD4 induces structural reorientation around the gp120 core. *Biophysical journal.* 2006;91(6):L69-71.
16. **Averbuch D, Schapiro JM, Lanier ER, Gradstein S, Gottesman G, Kedem E, et al.** Diminished selection for thymidine-analog mutations associated with the presence of M184V in Ethiopian children infected with HIV subtype C receiving lamivudine-containing therapy. *The Pediatric infectious disease journal.* 2006;25(11):1049-56.
17. **Ayoub A, Akoua-Koffi C, Adjogoua E, Calvignac S, Esteban A, Sabrina L et al.** Identification of a New HIV-2 Lineage in Rural Côte d'Ivoire: An Additional Cross-species Transmission from SIVsmm from Sooty Mangabeys to Humans. 19<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2012. Seattle. Abstract LB62.
18. **Ayoub A, Mauclore P, Martin PM, Cunin P, Mfoupouendoun J, Njinku B, et al.** HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerging infectious diseases.* 2001;7(3):466-7.
19. **Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Bethune MP, Kraus G, Boven K, et al.** TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010;54(2):718-27.
20. **Bachelor L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, et al.** Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *Journal of virology.* 2001; 75(11):4999-5008.
21. **Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, et al.** HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *The Journal of infectious diseases.* 2007; 195(8):1177-80.
22. **Baleta A.** Antiretroviral vaginal gel shows promise against HIV. *Lancet.* 2010; 376(9738):320.

23. **Balzarini J.** Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Current topics in medicinal chemistry.* 2004; 4(9):921-44.
24. **Bartolo I, Rocha C, Bartolomeu J, Gama A, Marcelino R, Fonseca M, et al.** Highly divergent subtypes and new recombinant forms prevail in the HIV/AIDS epidemic in Angola: new insights into the origins of the AIDS pandemic. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2009;9(4):672-82.
25. **Basmaciogullari S, Babcock GJ, Van Ryk D, Wojtowicz W, Sodroski J.** Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *Journal of virology.* 2002;76(21):10791-800.
26. **Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM.** HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity.* 1994;1(5):373-84.
27. **Beerenwinkel N, Gunthard HF, Roth V, Metzner KJ.** Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Frontiers in microbiology.* 2012;3:329.
28. **Berger EA, Murphy PM, Farber JM.** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology.* 1999;17:657-700.
29. **Berkhout B.** Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology.* 1996;54:1-34.
30. **Berkowitz R, Fisher J, Goff SP.** RNA packaging. *Current topics in microbiology and immunology.* 1996;214:177-218.
31. **Bertagnolio S, Parkin NT, Jordan M, Brooks J, Garcia-Lerma JG.** Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS reviews.* 2010;12(4):195-208.
32. **Bertagnolio S, Penazzato M, Jordan MR, Persaud D, Mofenson LM, Bennett DE.** World Health Organization generic protocol to assess drug-resistant HIV among children <18 months of age and newly diagnosed with HIV in resource-limited countries. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012;54 Suppl 4:S254-60.
33. **Bigaillon C, Mérens A, Rapp C.** Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne. *Rev Francoph laborat.* 2010; 422 : 69-82.
34. **Bikaako-Kajura W, Luyirika E, Purcell DW, Downing J, Kaharuza F, Mermin J,**

- et al.** Disclosure of HIV status and adherence to daily drug regimens among HIV-infected children in Uganda. *AIDS and behavior*. 2006;10(4 Suppl):S85-93.
35. **Blackard JT, Renjifo B, Chaplin B, Msamanga G, Fawzi W, Essex M.** Diversity of the HIV-1 long terminal repeat following mother-to-child transmission. *Virology*. 2000;274(2):402-11.
  36. **Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, Dunn DT, Teglas JP, Rouzioux C, et al.** Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1997;14(5):442-50.
  37. **Bochner R, Duvshani A, Adir N, Hizi A.** Mutagenesis of Gln294 of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-2 and its effects on the ribonuclease H activity. *FEBS letters*. 2008;582(18):2799-805.
  38. **Boden D, Markowitz M.** Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(11):2775-83.
  39. **Bollinger RC, Egan MA, Chun TW, Mathieson B, Siliciano RF.** Cellular immune responses to HIV-1 in progressive and non-progressive infections. *AIDS*. 1996;10 Suppl A:S85-96.
  40. **Bolton-Moore C, Mubiana-Mbewe M, Cantrell RA, Chintu N, Stringer EM, Chi BH, et al.** Clinical outcomes and CD4 cell response in children receiving antiretroviral therapy at primary health care facilities in Zambia. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298(16):1888-99.
  41. **Bouamr F, Scarlata S, Carter C.** Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry*. 2003;42(21):6408-17.
  42. **Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH.** The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*. 2002;76(7):3248-56.
  43. **Bracciale L, Fanti I, Di Giambenedetto S, Colafigli M, Prosperi M, Bacarelli A, et al.** Predictors of successful genotype-guided antiretroviral therapy in treatment-experienced individuals over calendar years: a cohort study. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;46(3):290-4.
  44. **Brady J, Kashanchi F.** Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology*. 2005; 2:69.
  45. **Brandt S, Blissenbach M, Grewe B, Konietzny R, Grunwald T, Uberla K.** Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. *PLoS pathogens*. 2007;3(4):e54.

46. **Brehm JH, Koontz D, Meteer JD, Pathak V, Sluis-Cremer N, Mellors JW.** Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *Journal of virology*. 2007;81(15):7852-9.
47. **Bremer JW, Lew JF, Cooper E, Hillyer GV, Pitt J, Handelsman E, et al.** Diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 by a DNA polymerase chain reaction assay among infants enrolled in the Women and Infants' Transmission Study. *The Journal of pediatrics*. 1996;129(2):198-207.
48. **Brenchley JM, Price DA, Douek DC.** HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology*. 2006;7(3):235-9.
49. **Broder S.** The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral research*. 2010;85(1):1-18.
50. **Brossard Y, Aubin JT, Mandelbrot L, Bignozzi C, Brand D, Chaput A, et al.** Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. *AIDS*. 1995;9(4):359-66.
51. **Buck WC, Kabue MM, Kazembe PN, Kline MW.** Discontinuation of standard first-line antiretroviral therapy in a cohort of 1434 Malawian children. *Journal of the International AIDS Society*. 2010;13:31.
52. **Bulterys M, Wilfert CM.** HAART during pregnancy and during breastfeeding among HIV-infected women in the developing world: has the time come? *AIDS*. 2009;23(18):2473-7.
53. **Buseyne F, Janvier G, Teglas JP, Ivanoff S, Burgard M, Bui E, et al.** Impact of heterozygosity for the chemokine receptor CCR5 32-bp-deleted allele on plasma virus load and CD4 T lymphocytes in perinatally human immunodeficiency virus-infected children at 8 years of age. *The Journal of infectious diseases*. 1998;178(4):1019-23.
54. **Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W.** Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS pathogens*. 2010;6(5):e1000880.
55. **Casado JL, Hertogs K, Ruiz L, Dronda F, Van Cauwenberge A, Arno A, et al.** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. *AIDS*. 2000;14(2):F1-7.
56. **Cassol S, Butcher A, Kinard S, Spadaro J, Sy T, Lapointe N, et al.** Rapid screening for early detection of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(11):2641-5.
57. **Cassol SA, Lapointe N, Salas T, Hankins C, Arella M, Fauvel M, et al.** Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spot specimens. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1992;5(2):113-9.

58. **Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B.** Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *Journal of virology*. 2002;76(15):7863-7.
59. **Chaix ML, Rouet F, Kouakoussui KA, Laguide R, Fassinou P, Montcho C, et al.** Genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated children in Abidjan, Cote d'Ivoire. *The Pediatric infectious disease journal*. 2005;24(12):1072-6.
60. **Chakraborty R.** HIV-1 infection in children: a clinical and immunologic overview. *Current HIV research*. 2005;3(1):31-41.
61. **Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997;89(2):263-73.
62. **Charpentier C, Gody JC, Mbitikon O, Moussa S, Matta M, Pere H, et al.** 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 research and human retroviruses*. 2012;28(1):87-94.
63. **Charpentier C, Gody JC, Tisserand P, Matta M, Pere H, Fournier J, et al.** Surveillance of antiretroviral drug resistance mutations in untreated young children living in the Central African Republic. *Antiviral therapy*. 2011;16(8):1347-50.
64. **Charpentier C, Laureillard D, Piketty C, Tisserand P, Batisse D, Karmochkine M, et al.** High frequency of integrase Q148R minority variants in HIV-infected patients naive of integrase inhibitors. *AIDS*. 2010;24(6):867-73.
65. **Chasela CS, Hudgens MG, Jamieson DJ, Kayira D, Hosseinipour MC, Kourtis AP, et al.** Maternal or infant antiretroviral drugs to reduce HIV-1 transmission. *The New England journal of medicine*. 2010;362(24):2271-81.
66. **Chen JC, Krucinski J, Miercke LJ, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, et al.** Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(15):8233-8.
67. **Chen Z, Luckay A, Sodora DL, Telfer P, Reed P, Gettie A, et al.** Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *Journal of virology*. 1997;71(5):3953-60.
68. **Chen Z, Telfier P, Gettie A, Reed P, Zhang L, Ho DD, et al.** Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *Journal of virology*. 1996;70(6):3617-27.

69. **Clotet B, Bellos N, Molina JM, Cooper D, Goffard JC, Lazzarin A, et al.** Efficacy and safety of darunavir-ritonavir at week 48 in treatment-experienced patients with HIV-1 infection in POWER 1 and 2: a pooled subgroup analysis of data from two randomised trials. *Lancet*. 2007;369(9568):1169-78.
70. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.
71. **Cohen CJ, Molina JM, Cahn P, Clotet B, Fourie J, Grinsztejn B, et al.** Efficacy and safety of rilpivirine (TMC278) versus efavirenz at 48 weeks in treatment-naïve HIV-1-infected patients: pooled results from the phase 3 double-blind randomized ECHO and THRIVE Trials. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60(1):33-42.
72. **Comeau AM, Harris JA, McIntosh K, Weiblen BJ, Hoff R, Grady GF.** Polymerase chain reaction in detecting HIV infection among seropositive infants: relation to clinical status and age and to results of other assays. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1992;5(3):271-8.
73. **Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al.** Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;331(18):1173-80.
74. **Conroy SA, Laeyendecker O, Redd AD, Collinson-Streng A, Kong X, Makumbi F, et al.** Changes in the distribution of HIV type 1 subtypes D and A in Rakai District, Uganda between 1994 and 2002. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(10):1087-91.
75. **Conseil National de lutte contre le SIDA et les IST.** 2012. Rapport de situation sur la riposte nationale à l'épidémie de VIH/SIDA. Sénégal : 2010-2011.
76. **Conseil National de lutte contre le SIDA et les IST.** 2012. Enquête national de surveillance combinée des IST et du VIH/SIDA-2010. Sénégal.
77. **Conseil National de Lutte contre le SIDA et les IST.** 2013. Surveillance sentinelle du VIH et de la syphilis chez les femmes enceintes au Sénégal. Laboratoire de Bactériologie Virologie CHU Aristide le Dantec-Dakar-Sénégal.
78. **Conway B, Wainberg MA, Hall D, Harris M, Reiss P, Cooper D, et al.** Development of drug resistance in patients receiving combinations of zidovudine, didanosine and nevirapine. *AIDS*. 2001;15(10):1269-74.
79. **Cotte L, Traub MA, Tardy JC, Brochier C, Gilibert RP, Miailhes P, et al.** Prediction of the virological response to etravirine in clinical practice: Comparison of three genotype algorithms. *Journal of medical virology*. 2009;81(4):672-7.

- 80. Creek TL, Sherman GG, Nkengasong J, Lu L, Finkbeiner T, Fowler MG, et al.** Infant human immunodeficiency virus diagnosis in resource-limited settings: issues, technologies, and country experiences. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;197(3 Suppl):S64-71.
- 81. Cullen BR.** The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*. 1990;63(4):655-7.
- 82. Cunningham CK, Charbonneau TT, Song K, Patterson D, Sullivan T, Cummins T, et al.** Comparison of human immunodeficiency virus 1 DNA polymerase chain reaction and qualitative and quantitative RNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus 1-exposed infants. *The Pediatric infectious disease journal*. 1999;18(1):30-5.
- 83. Dabis F, Bequet L, Ekouevi DK, Viho I, Rouet F, Horo A, et al.** Field efficacy of zidovudine, lamivudine and single-dose nevirapine to prevent peripartum HIV transmission. *AIDS*. 2005;19(3):309-18.
- 84. Dabis F, Ekpini ER.** HIV-1/AIDS and maternal and child health in Africa. *Lancet*. 2002;359(9323):2097-104.
- 85. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA.** The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.
- 86. Damond F, Descamps D, Farfara I, Telles JN, Puyeo S, Campa P, et al.** Quantification of proviral load of human immunodeficiency virus type 2 subtypes A and B using real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(12):4264-8.
- 87. Damond F, Simon F, Brun Vézinet F.** Le virus de l'immunodéficience humaine de type 2 *Virologie*. 2003; 7:329-38.
- 88. Dandekar DH, Ganesh KN, Mitra D.** HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic acids research*. 2004;32(4):1270-8.
- 89. De Clercq E.** The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral research*. 1998;38(3):153-79.
- 90. de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, Lancelot S, Opi S, et al.** HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology*. 2005;2:5.
- 91. de Martino M, Tovo PA, Balducci M, Galli L, Gabiano C, Rezza G, et al.** Reduction in mortality with availability of antiretroviral therapy for children with perinatal HIV-1 infection. Italian Register for HIV Infection in Children and the Italian National AIDS Registry. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2000; 284(2):190-7.

92. **de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, et al.** An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics*. 2005;21(19):3797-800.
93. **De Rossi A.** Virological and immunological response to antiretroviral therapy in HIV-1 infected children: genotypic and phenotypic assays in monitoring virological failure. *The new microbiologica*. 2004;27(2 Suppl 1):45-50.
94. **De Rossi A, Ades AE, Mammano F, Del Mistro A, Amadori A, Giaquinto C, et al.** Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction, and in vitro antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS*. 1991;5(1):15-20.
95. **de Silva TI, Cotten M, Rowland-Jones SL.** HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in microbiology*. 2008;16(12):588-95.
96. **Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al.** Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996;273(5283):1856-62.
97. **DeGruttola V, Dix L, D'Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, et al.** The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antiviral therapy*. 2000;5(1):41-8.
98. **Delamare C, Burgard M, Mayaux MJ, Blanche S, Doussin A, Ivanoff S, et al.** HIV-1 RNA detection in plasma for the diagnosis of infection in neonates. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association*. 1997;15(2):121-5.
99. **Delaugerre C.** Résistance aux nouveaux antirétroviraux. *La Lettre de l'Infectiologie*. 2008;23:169-74.
100. **Delaugerre C, Chaix ML.** Résistance du VIH aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. *Virologie* 2006;101:255-66.
101. **Delaugerre C, Chaix ML, Warszawski J, Rouzioux C, Blanche S.** [HIV-1 drug resistance in French infected-children: from newborn to adolescent]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2007;14(3):298-302.
102. **Delelis O, Carayon K, Saib A, Deprez E, Mouscadet JF.** Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*. 2008;5:114.
103. **Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, et al.** Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science*. 1993;262(5137):1257-61.

- 104. Depatureaux A, Leoz M, De Oliveira F, Gueudin M, Damond F, Descamps D, et al.** [Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data]. *Medecine et maladies infectieuses*. 2010;40(12):669-76. Epub 2010/07/22. Diagnostic spécifique et prise en charge des infections par un VIH-1 groupe O: donnees de RES-O.
- 105. Descamps D, Delaugerre C, Masquelier B, Ruffault A, Marcelin AG, Izopet J, et al.** Repeated HIV-1 resistance genotyping external quality assessments improve virology laboratory performance. *Journal of medical virology*. 2006;78(2):153-60.
- 106. Deshpande A, Jauvin V, Magnin N, Pinson P, Faure M, Masquelier B, et al.** Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. *AIDS research and human retroviruses*. 2007;23(2):335-40.
- 107. Diagbouga S, Chazallon C, Kazatchkine MD, Van de Perre P, Inwoley A, M'Boup S, et al.** Successful implementation of a low-cost method for enumerating CD4+ T lymphocytes in resource-limited settings: the ANRS 12-26 study. *AIDS*. 2003;17(15):2201-8.
- 108. di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG.** Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science*, 1986; 231:1289–1291.
- 109. Division de lutte contre le SIDA et les IST.** Ministère de la Santé, de la Prévention et de l'Action Sociale. Enquête Nationale sur la transmission mère-enfant du VIH. 2012a.
- 110. Division de lutte contre le SIDA et les IST.** Ministère de la Santé, de la Prévention et de l'Action Sociale. Rapport réunion adoption option B+. 2012b.
- 111. Dorenbaum A, Cunningham CK, Gelber RD, Culnane M, Mofenson L, Britto P, et al.** Two-dose intrapartum/newborn nevirapine and standard antiretroviral therapy to reduce perinatal HIV transmission: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;288(2):189-98.
- 112. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al.** Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(11):4721-32.
- 113. Douek DC, Picker LJ, Koup RA.** T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual review of immunology*. 2003;21:265-304.
- 114. D'Souza V, Summers MF.** How retroviruses select their genomes. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(8):643-55.
- 115. Dumond JB, Patterson KB, Pecha AL, Werner RE, Andrews E, Damle B, et al.** Maraviroc concentrates in the cervicovaginal fluid and vaginal tissue of HIV-negative women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;51(5):546-53.

- 116. Dunn DT, Brandt CD, Krivine A, Cassol SA, Roques P, Borkowsky W, et al.** The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS*. 1995;9(9):F7-11.
- 117. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, et al.** Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *Journal of the International AIDS Society*. 2010;13:4.
- 118. Eckert DM, Kim PS.** Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:777-810.
- 119. Elise A, France AM, Louise WM, Bata D, Francois R, Roger S, et al.** Assessment of adherence to highly active antiretroviral therapy in a cohort of African HIV-infected children in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(4):498-500.
- 120. Eshleman SH, Hoover DR, Chen S, Hudelson SE, Guay LA, Mwatha A, et al.** Resistance after single-dose nevirapine prophylaxis emerges in a high proportion of Malawian newborns. *AIDS*. 2005;19(18):2167-9.
- 121. Etienne L et Peeters Martine.** Origine du VIH : une réussite émergentielle. *Virologie*. 2010; 14: 171-84.
- 122. European mode of delivery collaboration.** Elective caesarean section *versus* vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet*. 1999; 353: 1035-9.
- 123. Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, et al.** Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *The New England journal of medicine*. 2008;359(14):1442-55.
- 124. Fauci AS, Mavilio D, Kottlil S.** NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(11):835-43.
- 125. Faye A, Le Chenadec J, Dollfus C, Thuret I, Douard D, Firtion G, et al.** Early versus deferred antiretroviral multidrug therapy in infants infected with HIV type 1. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(11):1692-8.
- 126. FDA notifications.** FDA approves raltegravir for HIV-1 treatment-naïve patients. *AIDS Alert*, 2009;24:106-7.
- 127. Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*. 1981;17(6):368-76.
- 128. Feng YX, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A.** The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *Journal of virology*. 1999;73(5):4251-6.

- 129. Ferreira FG, Pinto JA, Kakehasi FM, Cleto S, Tupinambas U, Aleixo AW, et al.** Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically Infected children in Belo Horizonte, Brazil. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(2):229-32.
- 130. Fitzon T, Leschonsky B, Bieler K, Paulus C, Schroder J, Wolf H, et al.** Proline residues in the HIV-1 NH2-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. *Virology*. 2000;268(2):294-307.
- 131. Fokam J, Salpini R, Santoro MM, Cento V, Perno CF, Colizzi V, et al.** Drug resistance among drug-naive and first-line antiretroviral treatment-failing children in Cameroon. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(12):1062-8.
- 132. Fraaij PL, Verweel G, van Rossum AM, van Lochem EG, Schutten M, Weemaes CM, et al.** Sustained viral suppression and immune recovery in HIV type 1-infected children after 4 years of highly active antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005; 40(4):604-8.
- 133. Fransen K, Zhong P, De Beenhouwer H, Carpels G, Peeters M, Louwagie J, et al.** Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes. *Molecular and cellular probes*. 1994;8(4):317-22.
- 134. Freed EO.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998;251(1):1-15.
- 135. Freed EO.** HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*. 2001;26(1-6):13-33.
- 136. Gaibelet G, Planchenault T, Mazeret S, Dumas F, Arenzana-Seisdedos F, Lopez A, et al.** CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(49):37921-9.
- 137. Gallo RC, Montagnier L.** The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England journal of medicine*. 2003;349(24):2283-5.
- 138. Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, et al.** Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*. 1997;278(5339):849-53.
- 139. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al.** Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
- 140. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, et al.** Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature*. 1992;358(6386):495-9.

- 141. Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC.** HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*. 2001;410(6830):834-8.
- 142. George E, Noel F, Bois G, Cassagnol R, Estavien L, Rouzier Pde M, et al.** Antiretroviral therapy for HIV-1-infected children in Haiti. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(10):1411-8.
- 143. Germanaud D, Derache A, Traore M, Madec Y, Toure S, Dicko F, et al.** Level of viral load and antiretroviral resistance after 6 months of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor first-line treatment in HIV-1-infected children in Mali. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(1):118-24.
- 144. Ghaffari G, Passalacqua DJ, Caicedo JL, Goodenow MM, Sleasman JW.** Two-year clinical and immune outcomes in human immunodeficiency virus-infected children who reconstitute CD4 T cells without control of viral replication after combination antiretroviral therapy. *Pediatrics*. 2004;114(5):e604-11.
- 145. Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI.** Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*. 1996;273(5272):231-5.
- 146. Gody JC, Charpentier C, Mbitikon O, Si-Mohamed A, LeGoff J, Gresenguet G, et al.** High prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-1 non-B subtype strains from African children receiving antiretroviral therapy regimen according to the 2006 revised WHO recommendations. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;49(5):566-9.
- 147. Goetghebuer T, Haelterman E, Le Chenadec J, Dollfus C, Gibb D, Judd A, et al.** Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants. *AIDS*. 2009;23(5):597-604.
- 148. Goila-Gaur R, Strebel K.** HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*. 2008;5:51.
- 149. Gonda MA.** Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *Journal of electron microscopy technique*. 1988;8(1):17-40.
- 150. Goodenow MM, Collman RG.** HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(5):965-72.
- 151. Gorny MK, Zolla-Pazner S.** Recognition by human monoclonal antibodies of free and complexed peptides representing the prefusogenic and fusogenic forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *Journal of virology*. 2000;74(13):6186-92.
- 152. Gortmaker SL, Hughes M, Cervia J, Brady M, Johnson GM, Seage GR 3rd, et al.** Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. *The New England journal of medicine*. 2001;345(21):1522-8.

153. **Gottlinger HG.** The HIV-1 assembly machine. *AIDS*. 2001;15 Suppl 5:S13-20.
154. **Goulder PJ, Jeena P, Tudor-Williams G, Burchett S.** Paediatric HIV infection: correlates of protective immunity and global perspectives in prevention and management. *British medical bulletin*. 2001;58:89-108.
155. **Green TN, Archary M, Gordon ML, Padayachi N, Lie Y, Anton ED, et al.** Drug resistance and coreceptor usage in HIV type 1 subtype C-infected children initiating or failing highly active antiretroviral therapy in South Africa. *AIDS research and human retroviruses*. 2012;28(4):324-32.
156. **Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, et al.** Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *Journal of virology*. 2002;76(6):2692-702.
157. **Groom HC, Anderson EC, Dangerfield JA, Lever AM.** Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 5):1141-7.
158. **Gordon M, Graham N, Bland R, et al.** Surveillance of resistance in KZN South Africa, including mother-infant pairs 6 weeks after single-dose NVP. *Antiviral Therapy*. 2004; 9:S80.
159. **Guest G, Shattuck D, Johnson L, Akumatey B, Clarke EE, Chen PL, et al.** Acceptability of PrEP for HIV prevention among women at high risk for HIV. *J Womens Health (Larchmt)*. 2010;19(4):791-8.
160. **Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al.** Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *The New England journal of medicine*. 2008;359(14):1429-41.
161. **Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, et al.** Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine*. 1997;337(11):734-9.
162. **Guo DX, Li HP, Li L, Zhuang DM, Jiao LY, Wang Z, et al.** Allele-specific real-time PCR testing for minor HIV-1 drug resistance mutations: assay preparation and application to reveal dynamic of mutations in vivo. *Chinese medical journal*. 2010;123(23):3389-95.
163. **Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, Kleiman L.** The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA<sup>3</sup>Lys annealing to viral RNA. *Journal of virology*. 2007;81(20):11322-31.
164. **Guo X, Roldan A, Hu J, Wainberg MA, Liang C.** Mutation of the SP1 sequence impairs both multimerization and membrane-binding activities of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Journal of virology*. 2005;79(3):1803-12.

- 165. Gupta RK, Ford D, Mulenga V, Walker AS, Kabamba D, Kalumbi M, et al.** Drug resistance in human immunodeficiency virus type-1 infected Zambian children using adult fixed dose combination stavudine, lamivudine, and nevirapine. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(8):e57-62.
- 166. Haase AT.** Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. 2010;464(7286):217-23.
- 167. Haberer JE, Cook A, Walker AS, Ngambi M, Ferrier A, Mulenga V, et al.** Excellent adherence to antiretrovirals in HIV+ Zambian children is compromised by disrupted routine, HIV nondisclosure, and paradoxical income effects. *PloS one*. 2011;6(4):e18505.
- 168. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM.** AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 2000;287(5453):607-14.
- 169. Hammer S, Crumpacker C, D'Aquila R, Jackson B, Lathey J, Livnat D, et al.** Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(10):2557-64.
- 170. Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, et al.** Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society--USA panel. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA*. 2006;14(3):827-43.
- 171. Hammonds J, Wang JJ, Spearman P.** Restriction of Retroviral Replication by Tetherin/BST-2. *Molecular biology international*. 2012;2012:424768.
- 172. Hare S, Di Nunzio F, Labeja A, Wang J, Engelman A, Cherepanov P.** Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. *PLoS pathogens*. 2009; 5(7):e1000515.
- 173. Hansasuta P, Rowland-Jones SL.** HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection. *British medical bulletin*. 2001;58:109-27.
- 174. Harries AD, Gomani P, Teck R, de Teck OA, Bakali E, Zachariah R, et al.** Monitoring the response to antiretroviral therapy in resource-poor settings: the Malawi model. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98(12):695-701.
- 175. Hartman TL, Buckheit RW, Jr.** The Continuing Evolution of HIV-1 Therapy: Identification and Development of Novel Antiretroviral Agents Targeting Viral and Cellular Targets. *Molecular biology international*. 2012;2012:401965.
- 176. Hauser A, Sewangi J, Mbezi P, Dugange F, Lau I, Ziske J, et al.** Emergence of minor drug-resistant HIV-1 variants after triple antiretroviral prophylaxis for prevention of vertical HIV-1 transmission. *PloS one*. 2012;7(2):e32055.

- 177. Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli JC, et al.** HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology*. 2010;7:51.
- 178. Hemelaar J.** The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(3):182-92.
- 179. Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, Hoffmann O, et al.** Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(7):599-606.
- 180. Hess C, Altfeld M, Thomas SY, Addo MM, Rosenberg ES, Allen TM, et al.** HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet*. 2004;363(9412):863-6.
- 181. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, et al.** Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. *Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. Journal of virology*. 2000;74(1):363-70.
- 182. Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, et al.** Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS research and human retroviruses*. 2002;18(18):1339-50.
- 183. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, et al.** Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(2):266-85.
- 184. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR.** An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989;339(6223):389-92.
- 185. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.** Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.
- 186. Hoelscher M, Dowling WE, Sanders-Buell E, Carr JK, Harris ME, Thomschke A, et al.** Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *AIDS*. 2002;16(15):2055-64.
- 187. Hollinger FB, Bremer JW, Myers LE, Gold JW, McQuay L.** Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group. The NIH/NIAID/DAIDS/ACTG Virology Laboratories. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(7):1787-94.
- 188. Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu TB, Taylor J.** Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *Journal of virology*. 1992;66(5):3179-82.

- 189. Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO.** p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *Journal of virology*. 1995;69(11):6810-8.
- 190. Hughes MD, Stein DS, Gundacker HM, Valentine FT, Phair JP, Volberding PA.** Within-subject variation in CD4 lymphocyte count in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: implications for patient monitoring. *The Journal of infectious diseases*. 1994;169(1):28-36.
- 191. Hughes SH.** Molecular matchmaking: NNRTIs can enhance the dimerization of HIV type 1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(13):6991-2.
- 192. Huthoff H, Berkhout B.** Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA*. 2001;7(1):143-57.
- 193. International Perinatal HIV Group.** The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. A meta-analysis of 15 prospective cohort studies. *N Engl J Med*. 1999; 340: 977-87.
- 194. Ioannidis JP, Abrams EJ, Ammann A, Bulterys M, Goedert JJ, Gray L, et al.** Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads <1000 copies/ml. *The Journal of infectious diseases*. 2001;183(4):539-45.
- 195. Ishikawa K, Janssens W, Banor JS, Shinno T, Piedade J, Sata T, et al.** Genetic analysis of HIV type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS research and human retroviruses*. 2001;17(17):1661-3.
- 196. Janssens B, Raleigh B, Soeung S, Akao K, Te V, Gupta J, et al.** Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in HIV-positive children: evaluation at 12 months in a routine program in Cambodia. *Pediatrics*. 2007;120(5):e1134-40.
- 197. Jaskolski M, Alexandratos JN, Bujacz G, Wlodawer A.** Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. *The FEBS journal*. 2009;276(11):2926-46.
- 198. Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout B.** Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *Journal of virology*. 2000;74(8):3740-51.
- 199. Jeremiah FR and Collins K L.** Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef: Adapting to Intracellular Trafficking Pathways. *Microbiol and Mol Biol Reviews*. 2006; 70(2):548–563.
- 200. Jiamsakul A, Kantor R, Li PC, Sirivichayakul S, Sirisanthana T, Kantipong P, et al.** Comparison of predicted susceptibility between genotype and virtual phenotype HIV drug resistance interpretation systems among treatment-naïve HIV-infected patients in Asia: TASER-M cohort analysis. *BMC research notes*. 2012;5:582.

- 201. Jittamala P, Puthanakit T, Chaiinseard S, Sirisanthana V.** Predictors of virologic failure and genotypic resistance mutation patterns in thai children receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy. *The Pediatric infectious disease journal.* 2009;28(9):826-30.
- 202. Johnson AA, Santos W, Pais GC, Marchand C, Amin R, Burke TR, Jr., et al.** Integration requires a specific interaction of the donor DNA terminal 5'-cytosine with glutamine 148 of the HIV-1 integrase flexible loop. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(1):461-7.
- 203. Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirell D, Watera C, Lyagoba F, et al.** Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *The Journal of infectious diseases.* 2002;185(9):1244-50.
- 204. Kameoka M, Morgan M, Binette M, Russell RS, Rong L, Guo X, et al.** The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *Journal of virology.* 2002;76(8):3637-45.
- 205. Kanya MR, Mayanja-Kizza H, Kambugu A, Bakeera-Kitaka S, Semitala F, Mwebaze-Songa P, et al.** Predictors of long-term viral failure among ugandan children and adults treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;46(2):187-93.
- 206. Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, et al.** Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *Journal of virological methods.* 2008;148(1-2):291-5.
- 207. Karmon SL, Markowitz M.** Next-generation integrase inhibitors : where to after raltegravir? *Drugs.* 2013;73(3):213-28.
- 208. Kebe K, Thiam M, Diagne Gueye NR, Diop H, Dia A, Signate Sy H, et al.** High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV type 1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines. *AIDS research and human retroviruses.* 2013;29(2):242-9.
- 209. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al.** Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science.* 2006;313(5786):523-6.
- 210. Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, et al.** Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *Journal of virology.* 2001;75(16):7462-9.

211. **Kesho Bora study group.** Eighteen-month follow of HIV-1-infected mothers and their children enrolled in the Kesho Bora study observational cohorts. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54:533-41.
212. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution.* 1980;16(2):111-20.
213. **Kiwanuka N, Laeyendecker O, Quinn TC, Wawer MJ, Shepherd J, Robb M, et al.** HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS.* 2009;23(18):2479-84.
214. **Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, et al.** Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases.* 2008;197(5):707-13.
215. **Kiwanuka N, Robb M, Laeyendecker O, Kigozi G, Wabwire-Mangen F, Makumbi FE, et al.** HIV-1 viral subtype differences in the rate of CD4+ T-cell decline among HIV seroincident antiretroviral naive persons in Rakai district, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54(2):180-4.
216. **Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA.** Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* 1992;256(5065):1783-90.
217. **Kondo E, Mammano F, Cohen EA, Gottlinger HG.** The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *Journal of virology.* 1995;69(5):2759-64.
218. **Koulinska IN, Villamor E, Msamanga G, Fawzi W, Blackard J, Renjifo B, et al.** Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus research.* 2006;120(1-2):191-8.
219. **Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al.** Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology.* 1994;68(7):4650-5.
220. **Kourtis AP, Bulterys M, Nesheim SR, Lee FK.** Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2001;285(6):709-12.
221. **Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M.** Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *The Lancet infectious diseases.* 2006;6(11):726-32.

- 222. Krausslich HG, Facke M, Heuser AM, Konvalinka J, Zentgraf H.** The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *Journal of virology*. 1995;69(6):3407-19.
- 223. Kuhmann SE, Hartley O.** Targeting chemokine receptors in HIV: a status report. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008;48:425-61.
- 224. Kumarasamy N, Venkatesh KK, Devaleenol B, Poongulali S, Mothi SN, Solomon S.** Safety, tolerability and effectiveness of generic HAART in HIV-infected children in South India. *Journal of tropical pediatrics*. 2009;55(3):155-9.
- 225. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, Trottier B, et al.** Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *The New England journal of medicine*. 2003;348(22):2175-85.
- 226. Lallemand M, Jourdain G, Le Coeur S, Mary JY, Ngo-Giang-Huong N, Koetsawang S, et al.** Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *The New England journal of medicine*. 2004;351(3):217-28.
- 227. Lama J, Mangasarian A, Trono D.** Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current biology : CB*. 1999;9(12):622-31.
- 228. Lambert JS, Harris DR, Stiehm ER, Moye J, Jr., Fowler MG, Meyer WA, 3rd, et al.** Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34(5):512-9.
- 229. Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, et al.** Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *The New England journal of medicine*. 2003;348(22):2186-95.
- 230. Le Rouzic E, Benichou S.** The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*. 2005;2:11.
- 231. Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, et al.** Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(47):45091-8.
- 232. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, et al.** Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *The New England journal of medicine*. 1999;340(22):1715-22.
- 233. Lecossier D, Shulman NS, Morand-Joubert L, Shafer RW, Joly V, Zolopa AR, et al.** Detection of minority populations of HIV-1 expressing the K103N resistance mutation in patients failing nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;38(1):37-42.

- 234. Leelawiwat W, Young NL, Chaowanachan T, Ou CY, Culnane M, Vanprapa N, et al.** Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of virological methods*. 2009;155(2):109-17.
- 235. Lekkerkerker AN, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB.** Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Current HIV research*. 2006;4(2):169-76.
- 236. Leroy V, Newell ML, Dabis F, Peckham C, Van de Perre P, Bulterys M, et al.** International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *Lancet*. 1998;352(9128):597-600.
- 237. Larrouy L, Brun-Vézinet F, Descamps D.** Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase. *Virologie* 2010, 14 (2) : 119-28
- 238. Levin A, Hayouka Z, Helfer M, Brack-Werner R, Friedler A, Loyter A.** Peptides derived from HIV-1 integrase that bind Rev stimulate viral genome integration. *PloS one*. 2009;4(1):e4155.
- 239. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY.** Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell research*. 2005;15(11-12):923-34.
- 240. Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L, Cen S.** APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(44):32065-74.
- 241. Liang C, Wainberg MA.** The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS reviews*. 2002;4(1):41-9.
- 242. Lichterfeld M, Wohrmann A, Schmeisser N, Fatkenheuer G, Salzberger B, Wyen C, et al.** Superior virological efficacy of ritonavir-boosted protease inhibitor regimens compared to single protease inhibitor therapy. *European journal of medical research*. 2003;8(2):56-60.
- 243. Lilian RR, Bhowan K, Sherman GG.** Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 infection in infants with the NucliSens EasyQ assay on dried blood spots. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2010;48(1):40-3.
- 244. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al.** Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.

245. **Liu S, Wu S, Jiang S.** HIV entry inhibitors targeting gp41: from polypeptides to small-molecule compounds. *Current pharmaceutical design.* 2007;13(2):143-62.
246. **Low AJ, Swenson LC, Harrigan PR.** HIV coreceptor phenotyping in the clinical setting. *AIDS reviews.* 2008;10(3):143-51.
247. **Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ, et al.** Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *The Journal of clinical investigation.* 2003;111(10):1547-54.
248. **Lutalo T, Gray RH, Wawer M, Sewankambo N, Serwadda D, Laeyendecker O, et al.** Survival of HIV-infected treatment-naive individuals with documented dates of seroconversion in Rakai, Uganda. *AIDS.* 2007;21 Suppl 6:S15-9.
249. **Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, Mongoina CO, Palakudy T, Koizumi Y, et al.** Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. *Journal of medical virology.* 2007;79(7):865-72.
250. **Madrid R, Janvier K, Hitchin D, Day J, Coleman S, Noviello C, et al.** Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(6):5032-44.
251. **Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS.** Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS pathogens.* 2010;6(4):e1000869.
252. **Mahy M, Stover J, Stanecki K, Stoneburner R, Tassie JM.** Estimating the impact of antiretroviral therapy: regional and global estimates of life-years gained among adults. *Sexually transmitted infections.* 2010;86 Suppl 2:ii67-71.
253. **Maiga AI, Descamps D, Morand-Joubert L, Malet I, Derache A, Cisse M, et al.** Resistance-associated mutations to etravirine (TMC-125) in antiretroviral-naive patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010;54(2):728-33.
254. **Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirlden M, et al.** Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008;52(4):1351-8.
255. **Mandelbrot L, Burgard M, Teglas JP, Benifla JL, Khan C, Blot P, et al.** Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *AIDS.* 1999;13(15):2143-9.
256. **Mandelbrot L, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Benifla JL, Delfraissy JF, et al.** Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1998;280(1):55-60.

257. **Manosuthi W, Chottanapand S, Thongyen S, Chaovavanich A, Sungkanuparph S.** Survival rate and risk factors of mortality among HIV/tuberculosis-coinfecting patients with and without antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(1):42-6.
258. **Marcelin AG, Calvez V.** Résistance du VIH aux inhibiteurs d'entrée. *Virologie* 2007;11:130-4.
259. **Masquelier B, Tamalet C, Montes B, Descamps D, Peytavin G, Bocket L, et al.** Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antiviral therapy.* 2004;9(3):315-23.
260. **Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, Cottalorda J, Krivine A, Simon F, et al.** Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1996;275(8):606-10.
261. **McColl DJ, Chen X.** Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing in a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral research.* 2010;85(1):101-18.
262. **McDermott AB, Koup RA.** CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease. *AIDS.* 2012;26(10):1281-92.
263. **McIntosh K, Pitt J, Brambilla D, Carroll S, Diaz C, Handelsman E, et al.** Blood culture in the first 6 months of life for the diagnosis of vertically transmitted human immunodeficiency virus infection. The Women and Infants Transmission Study Group. *The Journal of infectious diseases.* 1994;170(4):996-1000.
264. **McMichael AJ.** HIV vaccines. *Annual review of immunology.* 2006;24:227-55.
265. **Mehta N, Trzmielina S, Nonyane BA, Eliot MN, Lin R, Foulkes AS, et al.** Low-cost HIV-1 diagnosis and quantification in dried blood spots by real time PCR. *PloS one.* 2009;4(6):e5819.
266. **Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al.** Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine.* 1997;126(12):946-54.
267. **Menu E, Mbopi-Keou FX, Lagaye S, Pissard S, Maucelere P, Scarlatti G, et al.** Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *The Journal of infectious diseases.* 1999;179(1):44-51.
268. **Messiaen P, Verhofstede C, Vandenbroucke I, Dinakis S, Van Eygen V, Thys K, et al.** Ultra-deep sequencing of HIV-1 reverse transcriptase before start of an NNRTI-based regimen in treatment-naïve patients. *Virology.* 2012;426(1):7-11.

- 269. Metzner KJ, Rauch P, Braun P, Knechten H, Ehret R, Korn K, et al.** Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naive patients. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;50(2):156-61.
- 270. Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zollner B, Jessen H, et al.** Detection of **minor** populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS*. 2005;19(16):1819-25.
- 271. Michael NL, Louie LG, Sheppard HW.** CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet*. 1997;350(9079):741-2.
- 272. Miller LG, Liu H, Hays RD, Golin CE, Beck CK, Asch SM, et al.** How well do clinicians estimate patients' adherence to combination antiretroviral therapy? *Journal of general internal medicine*. 2002;17(1):1-11.
- 273. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB.** The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(1):101-13.
- 274. Ministère de la Santé et de la Prévention.** Division de lutte contre le SIDA et les IST. 2010. Directives nationales sur la prévention de la transmission mère enfant du VIH au Sénégal.
- 275. Ministère de la Santé et de la Prévention.** République du Sénégal. Service Nationale de l'Information Sanitaire. 2011. Carte Sanitaire du Sénégal : mise à jour de 2010.
- 276. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, et al.** Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS biology*. 2004;2(8):E234.
- 277. Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, et al.** Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS pathogens*. 2009;5(5):e1000450.
- 278. Mitsuya H, Jarrett RF, Matsukura M, Di Marzo Veronese F, DeVico AL, Sarngadharan MG, et al.** Long-term inhibition of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2',3'-dideoxynucleosides in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(7):2033-7.
- 279. Mofenson L, Taha T, Li Q, Kumwenda J, Kafulafula G.** Infant extended antiretroviral (ARV) prophylaxis is effective in preventing postnatal mother-to-child HIV transmission (MTCT) at all maternal CD4 counts. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis; Treatment and Prevention; 2009: Cape Town, South Africa. <http://www.ias2009.org/pag/Abstracts.aspx?AID=1251> (site consulté en janvier 2012).

- 280. Mofenson LM.** Prevention in neglected subpopulations: prevention of mother-to-child transmission of HIV infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2010;50 Suppl 3:S130-48.
- 281. Mohamad S, Deris ZZ, Yusoff NK, Ariffin TA, Shueb RH.** Assessing subtypes and drug resistance mutations among HIV-1 infected children who failed antiretroviral therapy in Kelantan, Malaysia. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases.* 2012;16(3):284-8.
- 282. Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M.** Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *Journal of virology.* 1997;71(11):8657-65.
- 283. Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK.** The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2008;72(1):54-84, table of contents.
- 284. Montes B, Vergne L, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, Segondy M.** Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;35(4):329-36.
- 285. Moorthy A, Gupta A, Bhosale R, Tripathy S, Sastry J, Kulkarni S, et al.** Nevirapine resistance and breast-milk HIV transmission: effects of single and extended-dose nevirapine prophylaxis in subtype C HIV-infected infants. *PloS one.* 2009;4(1):e4096.
- 286. Mulky A, Kappes JC.** Analysis of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase subunit structure/function in the context of infectious virions and human target cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2005;49(9):3762-9.
- 287. Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y.** Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *Journal of virology.* 2004;78(2):1026-31.
- 288. Nabukeera-Barungi N, Kalyesubula I, Kekitiinwa A, Byakika-Tusiime J, Musoke P.** Adherence to antiretroviral therapy in children attending Mulago Hospital, Kampala. *Annals of tropical paediatrics.* 2007;27(2):123-31.
- 289. Nair V, Chi G.** HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. *Reviews in medical virology.* 2007;17(4):277-95.
- 290. Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Overbaugh J, Mwatha A, et al.** Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2000;283(9):1167-74.

- 291. Ndiaye O, Leye N, Vidal N, Diop-Ndiaye H, Tchiakpè E, Kébé K, Thiam M, Diouara AAM, Wade A S, Toure-Kane C and Mboup S** Détection de co-infections avec plusieurs variants VIH-1 chez les MSM au Sénégal. 5<sup>ème</sup> Conférence francophone VIH/SIDA, Casablanca 2010. Résumé n°243/50A.
- 292. Nedellec R, Coetzer M, Lederman MM, Offord RE, Hartley O, Mosier DE.** Resistance to the CCR5 inhibitor 5P12-RANTES requires a difficult evolution from CCR5 to CXCR4 coreceptor use. *PloS one*. 2011;6(7):e22020.
- 293. Neil S, Bieniasz P.** Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(9):569-80.
- 294. Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD.** HIV-1 Vpu promotes release and prevents **endocytosis** of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS pathogens*. 2006;2(5):e39.
- 295. Neilson JR, John GC, Carr JK, Lewis P, Kreiss JK, Jackson S, et al.** Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *Journal of virology*. 1999;73(5):4393-403.
- 296. Nesheim S, Lee F, Kalish ML, Ou CY, Sawyer M, Clark S, et al.** Diagnosis of perinatal human **immunodeficiency** virus infection by polymerase chain reaction and p24 antigen detection after immune complex dissociation in an urban community hospital. *The Journal of infectious diseases*. 1997;175(6):1333-6.
- 297. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F.** Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet*. 2004;364(9441):1236-43.
- 298. Ngo-Giang-Huong N, Khamduang W, Leurent B, Collins I, Nantasen I, Leechanachai P, et al.** Early HIV-1 diagnosis using in-house real-time PCR amplification on dried blood spots for infants in remote and resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;49(5):465-71.
- 299. Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J.** Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2005;2:10.
- 300. Nisole S, Saib A.** Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:9.
- 301. Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, et al.** Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *Journal of virology*. 2007;81(10):5284-93. S
- 302. Nowotny M.** Retroviral integrase superfamily: the structural perspective. *EMBO reports*. 2009;10(2):144-51.

- 303. Nyandiko WM, Ayaya S, Nabakwe E, Tenge C, Sidle JE, Yiannoutsos CT, et al.** Outcomes of HIV-infected orphaned and non-orphaned children on antiretroviral therapy in western Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(4):418-25.
- 304. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD.** Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy **and** therapeutic failure. VA Cooperative Study Group on AIDS. *Annals of internal medicine.* 1997;126(12):939-45.
- 305. Odaibo GN, Olaleye DO, Heyndrickx L, Vereecken K, Houwer K, Jassens W.** Mother-to-child **transmission** of different HIV-1 subtypes among ARV Naive infected pregnant women in Nigeria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 2006;48(2):77-80.
- 306. Ono A.** HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future virology.* 2009;4(3):241-57.
- 307. ONUSIDA.** Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de SIDA. 2012. Disponible sur : [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_with\\_annexes\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_fr.pdf) (site consulté en avril 2013).
- 308. Organisation Mondiale de la Santé.** Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants. Recommendations for a public health approach. Organisation Mondiale de la Santé. 2010b. Disponible sur :[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818_eng.pdf) (site consulté en ligne en septembre 2012).
- 309. Organisation mondiale de la santé.** Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: Toward universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva. World Health Organization 2006; <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/paediatric020907.pdf> (Site consulté en juin 2013).
- 310. Organisation Mondiale de la Santé.** Antiretroviral therapy for HIV infection in children: Towards universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva: World Health Organisation. 2010a. <http://www.who.int/hiv/pub/paediatric/infants2010/en/>, (site consulté en juillet, 2012).
- 311. Organisation Mondiale de la Santé.** Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/download/en/index.html> (site consulté en août 2013).
- 312. Organisation Mondiale de la Santé.** La riposte mondiale au VIH/SIDA. Le point sur l'épidémie et sur les progrès du secteur de santé vers un accès universel. 2011. Disponible sur : [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789242502985\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789242502985_fre.pdf) (site consulté en avril 2013).

- 313. Organisation Mondiale de la Santé.** Utilisation des antirétroviraux pour traiter la femme enceinte et prévenir l'infection à VIH chez le nourrisson. Mise à jour programmatique. 2012. [http://www.who.int/hiv/pub/mtct/programmatic\\_update2012/fr/](http://www.who.int/hiv/pub/mtct/programmatic_update2012/fr/) (site consulté en avril 2013)
- 314. Oxford JS, Coates AR, Sia DY, Brown K, Asad S.** Potential target sites for antiviral inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV). *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1989;23 Suppl A:9-27.
- 315. Paar C, Geit M, Stekel H, Berg J.** Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 tropism by use of plasma and peripheral blood mononuclear cells in the routine clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(7):2697-9.
- 316. Padua E, Parreira R, Tendeiro R, Nunes B, Castela J, Soares I, et al.** Potential impact of viral load and genetic makeup of HIV type 1 on mother-to-child transmission: characterization of env-C2V3C3 and nef sequences. *AIDS research and human retroviruses.* 2009;25(11):1171-7.
- 317. Palombi L, Marazzi MC, Voetberg A, Magid NA.** Treatment acceleration program and the experience of the DREAM program in prevention of mother-to-child transmission of HIV. *AIDS.* 2007;21 Suppl 4:S65-71.
- 318. Pancera M.** Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus
- 319.** de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *Virologie* 2005, 9 : 457-72
- 320. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.** The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Seminars in immunology.* 1993;5(3):157-63.
- 321. Paredes R, Marconi VC, Campbell TB, Kuritzkes DR.** Systematic evaluation of allele-specific realtime PCR for the detection of minor HIV-1 variants with pol and env resistance mutations. *J Virol Methods.* Dec; 2007 146(1-2):136-146.
- 322. Paredes R, Sagar M, Marconi VC, Hoh R, Martin JN, Parkin NT, et al.** In vivo fitness cost of the M184V mutation in multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of lamivudine. *Journal of virology.* 2009;83(4):2038-43.
- 323. Park J, Morrow CD.** Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. *Virology.* 1993;194(2):843-50.
- 324. Pasquier C, Millot N, Njouom R, Sandres K, Cazabat M, Puel J, et al.** HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *Journal of virological methods.* 2001;94(1-2):45-54.

- 325. Patel K, Hernan MA, Williams PL, Seeger JD, McIntosh K, Dyke RB, et al.** Long-term effects of highly active antiretroviral therapy on CD4+ cell evolution among children and adolescents infected with HIV: 5 years and counting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(11):1751-60.
- 326. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, et al.** Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Annals of internal medicine*. 2000;133(1):21-30.
- 327. Patton JC, Akkers E, Coovadia AH, Meyers TM, Stevens WS, Sherman GG.** Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnostic laboratory. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(2):201-3.
- 328. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, et al.** Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nature medicine*. 1996;2(4):412-7.
- 329. Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN.** Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS*. 2003;17(18):2547-60.
- 330. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, et al.** Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*. 2009;139(3):499-511.
- 331. Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ.** A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *The EMBO journal*. 1993;12(9):3551-8.
- 332. Peterson L, Taylor D, Roddy R, Belai G, Phillips P, Nanda K, et al.** Tenofovir disoproxil fumarate for prevention of HIV infection in women: a phase 2, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS clinical trials*. 2007;2(5):e27.
- 333. Pettit SC, Michael SF and Swanstrom R.** The specificity of the HIV-1 protease. *Perspect. Drug Discov. Des.* 1993; 1:69-83.
- 334. Pieniazek D, Ellenberger D, Janini LM, Ramos AC, Nkengasong J, Sassan-Morokro M, et al.** Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS research and human retroviruses*. 1999;15(6):603-8.
- 335. Pierson TC, Doms RW.** HIV-1 entry and its inhibition. *Current topics in microbiology and immunology*. 2003;281:1-27.
- 336. Pilger D, Hauser A, Kuecherer C, Mugenyi K, Kabasinguzi R, Somogyi S, et al.** Minor drug-resistant HIV type-1 variants in breast milk and plasma of HIV type-1-infected Ugandan women after nevirapine single-dose prophylaxis. *Antiviral therapy*. 2011;16(1):109-13.

- 337. Piwowar-Manning E, Lugalia L, Kafufu B, Jackson JB.** Comparison of results obtained with Amplicor HIV-1 DNA PCR test version 1.5 using 100 versus 500 microliters of whole blood. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(3):1104-5.
- 338. Plantier JC, Damond F, Lasky M, Sankale JL, Apetrei C, Peeters M, et al.** V3 serotyping of HIV-1 infection: correlation with genotyping and limitations. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1999;20(5):432-41.
- 339. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871-2.
- 340. Podjanee J TP, Sukrapee C, Virat S.** Predictors of virologic failure and genotypic resistance mutation patterns in Thai children receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28:826-30.
- 341. Pollard VW, Malim MH.** The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology*. 1998;52:491-532.
- 342. Pond SJ, Ridgeway WK, Robertson R, Wang J, Millar DP.** HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(5):1404-8.
- 343. Posada D, Crandall KA.** Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13757-62.
- 344. Poveda E, Seclen E, Gonzalez Mdel M, Garcia F, Chueca N, Aguilera A, et al.** Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(5):1006-10.
- 345. Puthanakit T, Aupibul L, Oberdorfer P, Akarathum N, Kanjananit S, Wannarit P, et al.** Hospitalization and mortality among HIV-infected children after receiving highly active antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(4):599-604.
- 346. Puthanakit T, Jourdain G, Hongsiriwon S, Suntarattiwong P, Chokephaibulkit K, Sirisanthana V, et al.** HIV-1 drug resistance mutations in children after failure of first-line nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy. *HIV medicine*. 2010;11(9):565-72.

- 347. Puthanakit T, Kerr S, Ananworanich J, Bunupuradah T, Boonrak P, Sirisanthana V.** Pattern and predictors of immunologic recovery in human immunodeficiency virus-infected children receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based highly active antiretroviral therapy. *The Pediatric infectious disease journal.* 2009;28(6):488-92.
- 348. Puthanakit T, Oberdorfer A, Akarathum N, Kanjanavanit S, Wannarit P, Sirisanthana T, et al.** Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected children participating in Thailand's National Access to Antiretroviral Program. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2005;41(1):100-7.
- 349. Rainwater S, DeVange S, Sagar M, Ndinya-Achola J, Mandaliya K, Kreiss JK, et al.** No evidence for rapid subtype C spread within an epidemic in which multiple subtypes and intersubtype recombinants circulate. *AIDS research and human retroviruses.* 2005;21(12):1060-5.
- 350. Rakusan TA, Parrott RH, Sever JL.** Limitations in the laboratory diagnosis of vertically acquired HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991;4(2):116-21.
- 351. Reddi A, Leeper SC, Grobler AC, Geddes R, France KH, Dorse GL, et al.** Preliminary outcomes of a paediatric highly active antiretroviral therapy cohort from KwaZulu-Natal, South Africa. *BMC pediatrics.* 2007;7:13.
- 352. Reigadas S, Schrive MH, Aurillac-Lavignolle V, Fleury HJ.** Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood and plasma spots. *Journal of virological methods.* 2009;161(1):177-80.
- 353. Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, et al.** Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Journal of human virology.* 2001;4(1):16-25.
- 354. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, et al.** Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS.* 2004;18(12):1629-36.
- 355. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al.** HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000;288(5463):55-6.
- 356. Rodes B, Sheldon J, Toro C, Cuevas L, Perez-Pastrana E, Herrera I, et al.** Quantitative **detection** of plasma human immunodeficiency virus type 2 subtype A RNA by the Nuclisens EasyQ Assay (version 1.1). *Journal of clinical microbiology.* 2007;45(1):88-92.
- 357. Rohan LC, Moncla BJ, Kunjara Na Ayudhya RP, Cost M, Huang Y, Gai F, et al.** In vitro and ex vivo testing of tenofovir shows it is effective as an HIV-1 microbicide. *PloS one.* 2010;5(2):e9310.
- 358. Roquebert B, Marcelin AG, Descamps D, et al.,** La résistance du VIH aux inhibiteurs de l'intégrase. *Virologie* 2009;13:S35-S42.

- 359. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Apetrei C, Nerrienet E, Barre-Sinoussi F, et al.** Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*. 2004;18(10):1371-81.
- 360. Rosenbluh J, Hayouka Z, Loya S, Levin A, Armon-Omer A, Britan E, et al.** Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(21):15743-53.
- 361. Rouet F, Fassinou P, Inwoley A, Anaky MF, Kouakoussui A, Rouzioux C, et al.** Long-term survival and immuno-virological response of African HIV-1-infected children to highly active antiretroviral therapy regimens. *AIDS*. 2006;20(18):2315-9.
- 362. Rouet F, Foulongne V, Viljoen J, Steegen K, Becquart P, Valea D, et al.** Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *Journal of virological methods*. 2010;163(2):253-7.
- 363. Rouet F, Montcho C, Rouzioux C, Leroy V, Msellati P, Kottan JB, et al.** Early diagnosis of paediatric HIV-1 infection among African breast-fed children using a quantitative plasma HIV RNA assay. *AIDS*. 2001;15(14):1849-56.
- 364. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, et al.** Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *American journal of epidemiology*. 1995;142(12):1330-7.
- 365. Ruel TD, Kanya MR, Li P, Pasutti W, Charlebois ED, Liegler T, et al.** Early virologic failure and the development of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-1-infected Ugandan children. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(1):44-50.
- 366. Rulli SJ, Jr., Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, et al.** Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology*. 2006;347(2):364-71.
- 367. Russell B, Van Dyke, Kunjal Patel, George K. Siberry, Sandra K. Burchett, Stephen A. Spector, Miriam C. Chernoff et al.** Antiretroviral Treatment of U.S. Children with Perinatally-Acquired HIV Infection: Temporal Changes in Therapy between 1991 and 2009 and Predictors of Immunologic and Virologic Outcomes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 June 1; 57(2): 165–173.
- 368. Sackett K, Wexler-Cohen Y, Shai Y.** Characterization of the HIV N-terminal fusion peptide-containing region in context of key gp41 fusion conformations. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(31):21755-62.
- 369. Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4(4):406-25.

- 370. Sagar A, Vasudevan B.** Vertically transmitted HIV infection having first clinical manifestations at 13 y of age. *Indian journal of pediatrics.* 2012;79(9):1224-7.
- 371. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE.** Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS research and human retroviruses.* 1995;11(11):1423-5.
- 372. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al.** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996;382(6593):722-5.
- 373. Sanchez JM, Ramos Amador JT, Fernandez de Miguel S, Gonzalez Tomee MI, Rojo Conejo P, Ferrnado Vivas P, et al.** Impact of highly active antiretroviral therapy on the morbidity and mortality in Spanish human immunodeficiency virus-infected children. *The Pediatric infectious disease journal.* 2003;22(10):863-7.
- 374. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12):5463-7.
- 375. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, et al.** Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology.* 2005;79(19):12515-27.
- 376. Sax PE.** FDA approval: etravirine. *AIDS clinical care.* 2008;20(3):17-8.
- 377. Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL.** HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS pathogens.* 2008;4(8):e1000131.
- 378. Schafer A, Bogerd HP, Cullen BR.** Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology.* 2004;328(2):163-8.
- 379. Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, et al.** Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science.* 2011;333(6049):1633-7.
- 380. Scherrer AU, Hasse B, von Wyl V, Yerly S, Boni J, Burgisser P, et al.** Prevalence of etravirine mutations and impact on response to treatment in routine clinical care: the Swiss HIV Cohort Study (SHCS). *HIV medicine.* 2009;10(10):647-56.
- 381. Schiller DS, Youssef-Bessler M.** Etravirine: a second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clinical therapeutics.* 2009;31(4):692-704.

- 382. Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, et al.** CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *Journal of virology*. 1998;72(3):2280-8.
- 383. Schutten M, Peters D, Back NK, Beld M, Beuselinck K, Foulongne V, et al.** Multicenter evaluation of the new Abbott RealTime assays for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(6):1712-7.
- 384. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, et al.** Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(6):1411-9.
- 385. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al.** Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9:2388-413.
- 386. Sevilya Z, Loya S, Adir N, Hizi A.** The ribonuclease H activity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 is modulated by residue 294 of the small subunit. *Nucleic acids research*. 2003;31(5):1481-7.
- 387. Shapiro RL, Hughes MD, Ogwu A, Kitch D, Lockman S, Moffat C, et al.** Antiretroviral regimens in pregnancy and breast-feeding in Botswana. *The New England journal of medicine*. 2010;362(24):2282-94.
- 388. Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J.** Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *Journal of virology*. 2001;75(4):1834-41.
- 389. Sherman GG, Cooper PA, Coovadia AH, Puren AJ, Jones SA, Mokhachane M, et al.** Polymerase chain reaction for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infancy in low resource settings. *The Pediatric infectious disease journal*. 2005;24(11):993-7.
- 390. Sherman GG, Stevens G, Jones SA, Horsfield P, Stevens WS.** Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;38(5):615-7.
- 391. Sigaloff KC, Calis JC, Geelen SP, van Vugt M, de Wit TF.** HIV-1-resistance-associated mutations after failure of first-line antiretroviral treatment among children in resource-poor regions: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(10):769-79.
- 392. Siliciano JD, Siliciano RF.** A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(1):6-9.

- 393. Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al.** Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine*. 1998;4(9):1032-7.
- 394. Sitnikova T.** Bootstrap method of interior-branch test for phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1996;13(4):605-11.
- 395. Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, et al.** Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(2):694-701.
- 396. Sokal DC, Karim QA, Sibeko S, Yende-Zuma N, Mansoor LE, Baxter C, et al.** Safety of tenofovir gel, a vaginal microbicide, in South African women: results of the CAPRISA 004 Trial. *Antiviral therapy*. 2012.
- 397. Song R, Jelagat J, Dzombo D, Mwalimu M, Mandaliya K, Shikely K, et al.** Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected children in Kenya. *Pediatrics*. 2007a; 120(4):e856-61.
- 398. Song R, Kafaie J, Yang L, Laughrea M.** HIV-1 viral RNA is selected in the form of monomers that dimerize in a three-step protease-dependent process; the DIS of stem-loop 1 initiates viral RNA dimerization. *Journal of molecular biology*. 2007b;371(4):1084-98.
- 399. Sourdiz J, Nei M.** Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Molecular biology and evolution*. 1988; 5(3):298-311.
- 400. Spira R, Lepage P, Msellati P, Van De Perre P, Leroy V, Simonon A, et al.** Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group. *Pediatrics*. 1999; 104(5):e56.
- 401. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, et al.** Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*. 1986;45(5):637-48.
- 402. Stein DS, Korvick JA, Vermund SH.** CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *The Journal of infectious diseases*. 1992;165(2):352-63.
- 403. Steketee RW, Abrams EJ, Thea DM, Brown TM, Lambert G, Orloff S, et al.** Early detection of perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection using HIV RNA amplification and detection. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study. *The Journal of infectious diseases*. 1997;175(3):707-11.
- 404. Stellbrink HJ.** Raltegravir in the management of HIV-infected patients. *Drug design, development and therapy*. 2009;2:281-8.

- 405. Stevens W, Erasmus L, Moloi M, Taleng T, Sarang S.** Performance of a novel human immunodeficiency virus (HIV) type 1 total nucleic acid-based real-time PCR assay using whole blood and dried blood spots for diagnosis of HIV in infants. *Journal of clinical microbiology.* 2008;46(12):3941-5.
- 406. Stevens W, Wiggill T, Horsfield P, Coetzee L, Scott LE.** Evaluation of the NucliSens EasyQ assay in HIV-1-infected individuals in South Africa. *Journal of virological methods.* 2005;124(1-2):105-10.
- 407. Svicher V, D'Arrigo R, Alteri C, Andreoni M, Angarano G, Antinori A, et al.** Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: results from the OSCAR Study Group. *The new microbiologica.* 2010; 33(3):195-206.
- 408. Tang S, Murakami T, Cheng N, Steven AC, Freed EO, Levin JG.** Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants containing cores with abnormally high levels of capsid protein and virtually no reverse transcriptase. *Journal of virology.* 2003; 77(23):12592-602.
- 409. Temin HM, Mizutani S.**"Polymérase virale d'ADN ARN-dépendante: Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus " *Nature.*1970; 226 (5252):.1211-1213
- 410. Thior I, Lockman S, Smeaton LM, Shapiro RL, Wester C, Heymann SJ, et al.** Breastfeeding plus infant zidovudine prophylaxis for 6 months vs formula feeding plus infant zidovudine for 1 month to reduce mother-to-child HIV transmission in Botswana: a randomized trial: the Mashi Study. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* 2006; 296(7):794-805.
- 411. Tonwe-Gold B, Ekouevi DK, Viho I, Amani-Bosse C, Toure S, Coffie PA, et al.** Antiretroviral treatment and prevention of peripartum and postnatal HIV transmission in West Africa: evaluation of a two-tiered approach. *PLoS medicine.* 2007; 4(8):e257.
- 412. Towler WI, Barlow-Mosha L, Church JD, Bagenda D, Ajuna P, Mubiru M, et al.** Analysis of drug resistance in children receiving antiretroviral therapy for treatment of HIV-1 infection in Uganda. *AIDS research and human retroviruses.* 2010; 26(5):563-8.
- 413. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA.** Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS.* 2008;22(8):973-81.
- 414. Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, et al.** Short communication: Drug resistance mutations in the HIV type 1 protease and reverse transcriptase genes in antiretroviral-naïve Vietnamese children. *AIDS research and human retroviruses.* 2012; 28(10):1305-7.

- 415. Tscherning C, Alaeus a, Fredriksson R, Bjorndal a, Deng H, Littman DR, et al.** Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology*. 1998; 241(2):181-8.
- 416. Tsibris AM, Kuritzkes DR.** Chemokine antagonists as therapeutics: focus on HIV-1. *Annual review of medicine*. 2007; 58:445-59.
- 417. Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, et al.** Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(4):585-96.
- 418. Turner BG, Summers MF.** Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology*. 1999; 285(1):1-32.
- 419. Turner D, Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Wainberg MA.** Rationale for maintenance of the M184v resistance mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in treatment experienced patients. *The new microbiologica*. 2004; 27(2 Suppl 1):31-9.
- 420. Ugochukwu EF, Kanu SO.** Early infant diagnosis of HIV infection in southeastern Nigeria: prevalence of HIV infection among HIV-exposed babies. *West African journal of medicine*. 2010; 29(1):3-7.
- 421. US Food and Drug Administration.** Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. 2013. Disponible sur <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm> (site consulté en avril 2013).
- 422. Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembi N, Mbanja D, et al.** Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(1):109-15. Epub
- 423. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al.** Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology*. 2011;85(3):1403-7.
- 424. Van Duyne R, Easley R, Wu W, Berro R, Pedati C, Klase Z, et al.** Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR. *Retrovirology*. 2008;5:40.
- 425. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, et al.** Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 2006;444(7116):164.
- 426. van Rossum AM, Dieleman JP, Fraaij PL, Cransberg K, Hartwig NG, Burger DM, et al.** Persistent sterile leukocyturia is associated with impaired renal function in human immunodeficiency virus type 1-infected children treated with indinavir. *Pediatrics*. 2002;110(2 Pt 1):e19.

427. **van Rossum AM, Fraaij PL, de Groot R.** Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected children. *The Lancet infectious diseases.* 2002;2(2):93-102.
428. **van Zyl GU, Cotton MF, Claassen M, Abrahams C, Preiser W.** Surveillance of transmitted resistance to antiretroviral drug classes among young children in the Western Cape Province of South Africa. *The Pediatric infectious disease journal.* 2010;29(4):370-1.
429. **Vardabasso C, Manganaro L, Lusic M, Marcello A, Giacca M.** The histone chaperone protein Nucleosome Assembly Protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology.* 2008;5:8.
430. **Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, et al.** Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006;42(6):843-52.
431. **Vaz P, Augusto O, Bila D, Macassa E, Vubil A, Jani IV, et al.** Surveillance of HIV drug resistance in children receiving antiretroviral therapy: a pilot study of the World Health Organization's generic protocol in Maputo, Mozambique. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012;54 Suppl 4:S369-74.
432. **Vaz P, Chaix ML, Jani I, Macassa E, Bila D, Vubil A, et al.** Risk of extended viral resistance in human immunodeficiency virus-1-infected Mozambican children after first-line treatment failure. *The Pediatric infectious disease journal.* 2009;28(12):e283-7.
433. **Vergani B, Rusconi S.** Tipranavir in the protease inhibitors arena. *Drugs in R&D.* 2011;11(4):291-3.
434. **Vergne L, Kane CT, Laurent C, Diakhate N, Gueye NF, Gueye PM, et al.** Low rate of genotypic HIV-1 drug-resistant strains in the Senegalese government initiative of access to antiretroviral therapy. *AIDS.* 2003;17 Suppl 3:S31-8.
435. **Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, et al.** Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *Journal of clinical microbiology.* 2000;38(11):3919-25.
436. **Vessiere A, Rousset D, Kfutwah A, Leoz M, Depatureaux A, Simon F, et al.** Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;53(1):107-10.
437. **Vidal N, Bazepeo SE, Mulanga C, Delaporte E, Peeters M.** Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26\_A5U. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 25(8):823-832

- 438. Vidal N, Diop H, Montavon C, Butel C, Bosch S, Ngole EM, et al.** A novel multiregion hybridization assay reveals high frequency of dual inter-subtype infections among HIV-positive individuals in Cameroon, West Central Africa. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2013;14:73-82.
- 439. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, Babiker AG, Steyn J, Madhi SA, et al.** Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *The New England journal of medicine.* 2008;359(21):2233-44.
- 440. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Grassi JM, Granda BW, Duan SX, Fogelman SM, et al.** Protease inhibitors as inhibitors of human cytochromes P450: high risk associated with ritonavir. *Journal of clinical pharmacology.* 1998;38(2):106-11.
- 441. von Wyl V, Yerly S, Boni J, Burgisser P, Klimkait T, Battegay M, et al.** Factors associated with the emergence of K65R in patients with HIV-1 infection treated with combination antiretroviral therapy containing tenofovir. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2008;46(8):1299-309.
- 442. Wade AM, Ades AE.** Incorporating correlations between measurements into the estimation of age-related reference ranges. *Statistics in medicine.* 1998;17(17):1989-2002.
- 443. Wainberg MA.** Combination therapies, effectiveness, and adherence in patients with HIV infection: clinical utility of a single tablet of emtricitabine, rilpivirine, and tenofovir. *HIV AIDS (Auckl).* 2013;5:41-9.
- 444. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, et al.** Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature.* 2011;477(7365):466-70.
- 445. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al.** Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science.* 2009;326(5950):285-9.
- 446. Walker CM, Thomson-Honnebier GA, Hsueh FC, Erickson AL, Pan LZ, Levy JA.** CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals inhibit acute infection by human and primate immunodeficiency viruses. *Cellular immunology.* 1991;137(2):420-8.
- 447. Wallis CL, Erasmus L, Varughese S, Ndiweni D, Stevens WS.** Emergence of drug resistance in HIV-1 subtype C infected children failing the South African national antiretroviral roll-out program. *The Pediatric infectious disease journal.* 2009;28(12):1123-5.
- 448. Wamalwa DC, Farquhar C, Obimbo EM, Selig S, Mbori-Ngacha DA, Richardson BA, et al.** Early response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected Kenyan children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(3):311-7.

- 449. Waning B, Diedrichsen E, Jambert E, Barnighausen T, Li Y, Pouw M, et al.** The global pediatric **antiretroviral** market: analyses of product availability and utilization reveal challenges for development of pediatric formulations and HIV/AIDS treatment in children. *BMC pediatrics*. 2010;10:74.
- 450. Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM.** Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science*. 1990;249(4974):1281-5.
- 451. Weiss RA.** HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB life*. 2002;53(4-5):201-5.
- 452. Wendel CS, Mohler MJ, Kroesen K, Ampel NM, Gifford AL, Coons SJ.** Barriers to use of electronic adherence monitoring in an HIV clinic. *The Annals of pharmacotherapy*. 2001;35(9):1010-5.
- 453. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al.** Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995;375(6531):497-500.
- 454. Westendorp MO, Li-Weber M, Frank RW, Krammer PH.** Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *Journal of virology*. 1994;68(7):4177-85.
- 455. Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ.** Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(21):9770-4.
- 456. Wills JW, Craven RC.** Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS*. 1991;5(6):639-54.
- 457. Witvrouw M, Van Maele B, Vercammen J, Hantson A, Engelborghs Y, De Clercq E, et al.** Novel inhibitors of HIV-1 integration. *Current drug metabolism*. 2004;5(4):291-304.
- 458. Wiznia A, Church J, Emmanuel P, Eppes S, Rowell L, Evans C, et al.** Safety and efficacy of enfuvirtide for 48 weeks as part of an optimized antiretroviral regimen in pediatric human immunodeficiency virus 1-infected patients. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007;26(9):799-805.
- 459. Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, et al.** Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(9):1489-96.
- 460. Yang C, Li M, Newman RD, Shi YP, Ayisi J, van Eijk AM, et al.** Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *AIDS*. 2003;17(11):1667-74.

461. **Yang ZY, Chakrabarti BK, Xu L, Welcher B, Kong WP, Leung K, et al.** Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope. *Journal of virology*. 2004;78(8):4029-36.
462. **Young NL, Shaffer N, Chaowanachan T, Chotpitayasunondh T, Vanparapar N, Mock PA, et al.** Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24(5):401-7.
463. **Yu XF, Dawson L, Tian CJ, Flexner C, Dettenhofer M.** Mutations of the human immunodeficiency virus type 1 p6Gag domain result in reduced retention of Pol proteins during virus assembly. *Journal of virology*. 1998;72(4):3412-7.
464. **Zaccarelli M, Perno CF, Forbici F, Cingolani A, Liuzzi G, Bertoli A, et al.** Using a database of HIV patients undergoing genotypic resistance test after HAART failure to understand the dynamics of M184V mutation. *Antiviral therapy*. 2003; 8(1):51-6.
465. **Zeh C, Weidle PJ, Nafisa L, Lwamba HM, Okonji J, Anyango E, et al.** HIV-1 drug resistance emergence among breastfeeding infants born to HIV-infected mothers during a single-arm trial of triple-antiretroviral prophylaxis for prevention of mother-to-child transmission: a secondary analysis. *PLoS medicine*. 2011; 8(3):e1000430.
466. **Zhang F, Haberer J, Wei H, Wang N, Chu A, Zhao Y, et al.** Drug resistance in the Chinese National Pediatric Highly Active Antiretroviral Therapy Cohort: implications for paediatric treatment in the developing world. *International journal of STD & AIDS*. 2009;20(6):406-9.
467. **Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G.** The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2011; 38(3):95-109.
468. **Zheng R, Jenkins TM, Craigie R.** Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(24):13659-64.
469. **Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, et al.** Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*. 2010; 329(5993):811-7.
470. **Zolfo M, De Weggheleire A, Schouten E, Lynen L.** Time for "test and treat" in prevention of mother-to-child transmission programs in low- and middle-income countries. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 55(3):287-9.
471. **Zwart G, Wolfs TF, Bookelman R, Hartman S, Bakker M, Boucher CA, et al.** Greater diversity of the HIV-1 V3 neutralization domain in Tanzania compared with The Netherlands: serological and genetic analysis. *AIDS*. 1993;7(4):467-74

# ***Annexes***

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Diversité génétique et évolution des différentes lignées SIV et VIH.....	5
<b>Figure 2 :</b> Arbre illustrant la proximité phylogénétique des séquences de VIH-1 groupe M et N avec les séquences de SIVcpzPtt ainsi que la proximité des séquences de SIVgor avec les séquences de VIH-1 groupe O et P.....	7
<b>Figure 3 :</b> Arbre phylogénétique des VIH-2 et SIVsmm.....	8
<b>Figure 4 :</b> Coupe schématique du virus de l'immunodéficience humaine.....	9
<b>Figure 5 :</b> Organisation génomique du VIH-1 et du VIH-2.....	10
<b>Figure 6 :</b> Schéma du LTR 5' du provirus.....	11
<b>Figure 7 (A et B) :</b> Schéma du leader RNA du provirus.....	12
<b>Figure 8 :</b> Organisation du gène gag et production des particules virales.....	13
<b>Figure 9 :</b> Structure schématique de la protéase du VIH.....	16
<b>Figure 10 :</b> Schéma de la transcriptase inverse dans un complexe avec un acide nucléique.....	17
<b>Figure 11 :</b> Représentation schématique de l'intégrase du VIH.....	18
<b>Figure 12 :</b> Représentation schématique du précurseur gp160 .....	20
<b>Figure 13 :</b> Rôle de la gp41 dans l'entrée du VIH dans la cellule .....	22
<b>Figure 14 :</b> Domaines fonctionnels de la protéine Tat .....	23
<b>Figure 15 :</b> Modèle de dégradation de APOBEC3G induite par la protéine Vif.....	25
<b>Figure 16 :</b> Phase précoces (A) et phase tardive (B) du cycle de réplication du VIH-1.....	29
<b>Figure 17 :</b> Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral .....	32
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique de la réaction catalysée par l'intégrase virale durant le cycle de réplication du virus.....	33
<b>Figure 19 :</b> Distribution géographique des formes génétiques du VIH-1.....	39
<b>Figure 20 :</b> Nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH dans le monde (1990-2010).....	54
<b>Figure 21 :</b> Nombre de nouvelles infections par le VIH chez l'enfant dans les pays à revenus faibles ou moyens, 1995-2010 .....	55
<b>Figure 22 :</b> Molécules antirétrovirales et cibles.....	75
<b>Figure 23 :</b> Schématisation de la sélection de mutants résistants sous la pression de sélection des antirétroviraux.....	89
<b>Figure 24 :</b> Barrière génétique des ARV.....	90
<b>Figure 25 :</b> Principales étapes de réalisation des génotypes de résistance.....	95
<b>Figure 26 :</b> Comparaison d'une séquence de la TI à la séquence de référence.....	95
<b>Figure 27:</b> Distribution des valeurs de charge virale plasmatique chez les 125 enfants.....	112
<b>Figure 28:</b> Prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse..	113
<b>Figure 29:</b> Prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	114
<b>Figure 30:</b> Arbre phylogenetique en Neighbor Joining des 52 séquences du gène <i>pol</i> sur un alignement de 1010 pb.....	115

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Différentes options pour le programme PTME.....	61
<b>Tableau II :</b> Classification pédiatrique de l’OMS du VIH/SIDA.....	67
<b>Tableau III :</b> Critères de réalisation d’un diagnostic présomptif d’une infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois lorsque les tests virologiques ne sont pas disponibles.....	69
<b>Tableau IV:</b> Liste des ARV commercialisés en 2012.....	76
<b>Tableau V :</b> Molécules ARV disponibles pour le traitement de l’infection à VIH pédiatrique.....	82
<b>Tableau VI :</b> Récapitulatif des combinaisons de préférence de première ligne en pédiatrie.....	83
<b>Tableau VII :</b> Première et deuxième ligne de préférence en pédiatrie.....	84
<b>Tableau VIII :</b> Evaluation immuno-virologique du traitement antirétroviral chez les enfants vivants avec le VIH, dans les pays à ressources limitées.....	86
<b>Tableau IX :</b> Tableau récapitulatif des mutations de résistance concernant les 25 enfants.....	121
<b>Tableau X :</b> Prévalence de la résistance chez les enfants en échec virologique sous première ligne de traitement ARV dans des pays à ressources limitées.....	124

# **Sommaire**



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1- Le VIH: Définition-Classification-Origin</b> .....	<b>4</b>
1- Définition.....	4
2- Classification.....	4
3- Origine du VIH.....	5
3-1 Origine du VIH-1 .....	6
3-2 Origine du VIH-2 .....	7
<b>Chapitre 2: Biologie du virus</b> .....	<b>9</b>
1- Morphologie et structure.....	9
2- Organisation génomique du VIH.....	10
2-1 Les LTR .....	11
2-2 Le gène gag (gène des antigènes de groupe).....	13
2-3 Le gène pol .....	14
2-3-1 La protéase virale (PR) .....	15
2-3-2 La transcriptase inverse .....	16
2-3-3 L'intégrase .....	18
2-4 Le gène env .....	19
2-4-1 La glycoprotéine de surface gp120 .....	20
2-4-2 La gp41 (transmembranaire).....	21
2-5 Les gènes de régulation tat et rev et les gènes auxiliaires vif, vpr, vpu et nef.....	22
2-5-1 Le gène tat (trans-activator of transcription) .....	22
2-5-2 Le gène rev (regulator of expression virus) .....	24
2-5-3 Le gène vif (viron infectivity factor) .....	25
2-5-4 Le gène vpr (viral protein R) .....	26
2-5-5 Le gène vpu (viral protein U) .....	26
2-5-6 Le gène nef (negative expression factor).....	27
<b>3- Cycle de réplication du VIH-1</b> .....	<b>28</b>
3-1 Phase précoce.....	30
3-1-1 L'attachement de la particule virale à une cellule .....	30
3-1-2 La fusion, l'entrée et la décapsidation .....	30
3-1-3 La transcription inverse .....	31
3-1-4 L'intégration de l'ADN viral .....	32
3-2 Phase tardive .....	34
3-2-1 Transcription, Epissage, Traduction de l'ARN et Maturation des protéines .....	34
3-2-2 Assemblage.....	35
3-2-3 Bourgeonnement et Maturation des virus.....	35
<b>4- Facteurs de restriction de la cellule hôte</b> .....	<b>36</b>
<b>Chapitre 3- Diversité génétique - Epidémiologie</b> .....	<b>37</b>
<b>1- Variabilité génétique du VIH</b> .....	<b>37</b>
1-1 Répartition des sous-types/CRFs du VIH-1 dans le monde .....	38
1-2 Mécanismes de la diversité génétique.....	40
1-2-1 Faible fidélité de la transcriptase inverse.....	40
1-2-2 Pressions de sélection .....	40
1-2-3 Recombinaison génétique .....	41
1-3 Conséquences de la diversité génétique.....	42
1-3-1 Conséquences sur la transmission et la progression de la maladie .....	42
1-3-2 Impact sur le diagnostic et la mesure de la charge virale.....	43
1-3-3 Impact sur la réponse au traitement ARV et la résistance .....	45
1-3-4 Impact sur la prévention .....	45

<b>1-4 Méthodes d'étude de la diversité génétique</b> .....	<b>47</b>
1-4-1 Détermination du génotype par analyse phylogénétique.....	47
1-4-2 Génotypage par HMA ou « Heteroduplex Mobility Assay ».....	51
1-4-3 Génotypage par MHA ("Multi-region Hybridation Assay").....	51
1-4-4 Sérotypage.....	51
<b>2- Epidémiologie de l'infection à VIH</b> .....	<b>52</b>
<b>Chapitre 4 - VIH/SIDA en pédiatrie</b> .....	
<b>1-Epidémiologie</b> .....	<b>54</b>
<b>1-1 Afrique Sub-saharienne</b> .....	<b>55</b>
<b>1-2 Asie</b> .....	<b>56</b>
<b>1-3 Europe orientale et Asie centrale</b> .....	<b>56</b>
<b>1-4 Caraïbes</b> .....	<b>56</b>
<b>1-5 Amériques latine</b> .....	<b>56</b>
<b>1-6 Amérique du Nord et Europe occidentale et centrale</b> .....	<b>57</b>
<b>1-7 Moyen orient et Afrique du Nord</b> .....	<b>57</b>
<b>1-8 Océanie</b> .....	<b>57</b>
<b>2- Transmission du VIH de la mère à l'enfant et prévention</b> .....	<b>57</b>
<b>2-1 Moment de la transmission</b> .....	<b>58</b>
<b>2-2 Mécanismes de la transmission</b> .....	<b>58</b>
<b>2-3 Moyens de prévention de la transmission</b> .....	<b>59</b>
2-3-1 Antirétroviraux.....	59
2-3-2 Césarienne programmée.....	62
2-3-3 Prévention lors de l'allaitement.....	62
<b>3- Physiopathologie de l'infection</b> .....	<b>63</b>
<b>3-1 Cellules cibles du VIH</b> .....	<b>63</b>
<b>3-2 Organes lymphoïdes: cibles précoces du VIH</b> .....	<b>63</b>
<b>3-3 Conséquences de la réplication du VIH in vivo</b> .....	<b>64</b>
<b>4- Aspects cliniques de la maladie</b> .....	<b>65</b>
<b>4-1 Forme rapidement évolutive</b> .....	<b>65</b>
<b>4-2 Forme lente évolutive</b> .....	<b>66</b>
<b>4-3 La classification de l'OMS</b> .....	<b>66</b>
<b>5- Diagnostic</b> .....	<b>68</b>
<b>5- 1 Diagnostic clinique</b> .....	<b>68</b>
<b>5-2 Diagnostic biologique</b> .....	<b>69</b>
5-2-1 Diagnostic moléculaire.....	70
5-2-2 La culture virale.....	72
5-2-3 Intérêt du papier buvard.....	72
<b>6- Prise en charge thérapeutique de l'infection</b> .....	<b>73</b>
<b>6-1 Le traitement antirétroviral</b> .....	<b>73</b>
<b>6-2 Les molécules antirétrovirales : classes existantes</b> .....	<b>74</b>
6-2-1 Les inhibiteurs d'entrée.....	77
6-2-2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	78
6-2-3 Les inhibiteurs de l'intégrase.....	80
6-2-4 Les inhibiteurs de la protéase.....	80
<b>6-3 Molécules antirétrovirales disponibles en pédiatrie</b> .....	<b>81</b>
6-3-1 Traitement ARV de première ligne en pédiatrie.....	83
6-3-2 Choix de la seconde ligne de traitement ARV pédiatrique.....	84
<b>7- Monitoring et suivi de l'enfant sous TARV</b> .....	<b>84</b>
<b>7-1 Numération des lymphocytes T CD4</b> .....	<b>85</b>
<b>7-2 La charge virale</b> .....	<b>87</b>
<b>7-3 Observance du traitement ARV</b> .....	<b>87</b>
<b>8- La résistance du VIH aux molécules antirétrovirales</b> .....	<b>88</b>
<b>8-1 Mécanismes généraux</b> .....	<b>89</b>
<b>8-2 Principaux mécanismes de résistance par classe</b> .....	<b>90</b>

8-2-1 INTI .....	90
8-2-2 INNTI .....	91
8-2-3 Inhibiteurs de protéase .....	92
8-2-4 Inhibiteurs d'intégrase .....	92
8-2-5 Inhibiteurs d'entrée .....	93
<b>8-3 Outils de détection de la résistance.....</b>	<b>94</b>
8-3-1 Les tests génotypiques .....	94
8-3-2 Les tests phénotypiques .....	96
8-3-3 Les tests de tropisme.....	96
8-3-4 Le phénotype virtuel.....	97
8-3-5 Détermination du quotient d'inhibition génotypique (QIG).....	97
8-3-6 Tests ultra sensibles pour la détection des variants minoritaires résistants .....	98
<b>9- L'échec thérapeutique en pédiatrie.....</b>	<b>98</b>
<b>9-1 Critères cliniques.....</b>	<b>99</b>
<b>9-2 Critères immunologiques.....</b>	<b>99</b>
<b>9-3 Critères virologiques.....</b>	<b>99</b>
<b>1- Contexte .....</b>	<b>100</b>
<b>1-1 Informations générales sur le Sénégal.....</b>	<b>100</b>
1-1-1 Situation géographique et population .....	100
1-1-2 Situation sanitaire .....	100
1-1-3 Situation épidémiologique du VIH/SIDA.....	101
1-1-4 SIDA pédiatrique au Sénégal (DLSI).....	101
<b>2- Cadre de l'étude et justificatifs .....</b>	<b>102</b>
<b>3- Analyse des travaux .....</b>	<b>104</b>

### **Diagnostic néonatal de l'infection à VIH: ARN versus ADN**

**Article 1:** RNA versus DNA (NucliSENSEeasyQ HIV-1 v1.2 versus Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5) for Early Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants in Senegal

<b>1- Problématique .....</b>	<b>106</b>
<b>2- Objectifs .....</b>	<b>107</b>
<b>3- Méthodologie .....</b>	<b>107</b>
<b>4- Résultats.....</b>	<b>107</b>
4-1 Comparaison en utilisant les buffycoat .....	107
4-2 Comparaison avec les DBS.....	107
4-3 Charges virales et densités optiques .....	108
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>108</b>

### **Résistance du VIH-1 aux antirétroviraux chez les enfants**

**Article 2:** High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines

<b>1- Problématique .....</b>	<b>110</b>
<b>2- Objectifs .....</b>	<b>110</b>
<b>3- Méthodologie .....</b>	<b>111</b>
3-1 Population d'étude .....	111
3-2 Analyses virologiques.....	111
<b>4- Résultats.....</b>	<b>111</b>
4-1 Population d'étude et distribution des charges virales .....	111
4-2 Profils de résistance génotypiques .....	112
4-3 Mutations de résistance aux INTI .....	113
4-4 Mutations de résistance aux INNTI.....	114
4-5 Mutations de résistance aux IP .....	114
4-6 Diversité génétique du VIH-1.....	115

<b>4-7 Interprétation des tests de résistance et des futures options thérapeutiques possibles.....</b>	<b>116</b>
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>116</b>

**Article 3:** The case for addressing primary resistance mutations to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors to treat children born from HIV-infected mother in sub-Saharan Africa

<b>1-Problématique .....</b>	<b>118</b>
<b>2-Objectif.....</b>	<b>118</b>
<b>3-Méthodologie .....</b>	<b>119</b>
<b>3-1 Population d'étude .....</b>	<b>119</b>
<b>3-2 Test de génotypage et algorithmes d'interprétation .....</b>	<b>119</b>
<b>4- Résultats .....</b>	<b>120</b>
<b>4-1 Population d'étude .....</b>	<b>120</b>
<b>4-2 Profils génotypiques de résistance .....</b>	<b>120</b>
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>121</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>122</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>129</b>
<b>Références .....</b>	<b>134</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>177</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>178</b>

**Auteur : Khady Kébé Fall**

### **Résumé**

Notre travail a porté sur deux aspects du suivi virologique de l'infection par le VIH chez l'enfant. Les objectifs étaient:

- d'évaluer les performances du NucliSENS pour le diagnostic néonatal de l'infection à VIH
- de déterminer la prévalence de la résistance aux ARV chez les enfants sous trithérapie après au moins 6 mois et chez ceux n'étant pas encore sous traitement.

Nous avons pu montrer que, comparé au AmpliCor, le NucliSENS a une sensibilité et une spécificité de 100%. De ce fait, cette plateforme constitue une bonne alternative pour le diagnostic néonatal. C'est grâce à ce diagnostic que l'enfant va être mis sous antirétroviraux (ARV) ou pas. Ce traitement antirétroviral rencontre beaucoup de difficultés et son efficacité est parfois entravée par l'émergence de la résistance. Dans notre première étude de résistance, nous avons montré qu'il y avait, 56% d'enfants en échec virologique de première ligne. Chez ces enfants, la prévalence de la résistance aux ARV était de 92%. Des mutations conférant la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques et aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ont été retrouvées chez 88% et 99% respectivement. Une seconde étude de résistance avait porté sur des nouveaux nés naifs de trithérapie ARV. Un total de 25 nouveaux nés ont constitué la population d'étude. Treize d'entre eux ont été infectés en dépit d'une prévention de la transmission mère-enfant par une prophylaxie basée sur la NVP. Les résultats du génotypage de la TI ont permis de trouver une prévalence de la résistance égale à 32%. Des mutations de résistance aux INNTI ont été retrouvées chez tous les enfants qui avaient des virus résistants. L'infection à VIH pédiatrique reste problématique, d'où la nécessité de renforcer le suivi virologique pour une optimisation de la prise en charge des enfants.

---

### **Pediatric HIV-1 in Sénégal: Diagnostic and Antiretrovirals Resistance**

#### **Summary**

We focused on two major virological monitoring aspects of pediatric HIV infection. The objectives were:

- to evaluate the NucliSENS for HIV early infant diagnosis (EID)
- to assess the prevalence of HIV resistance in children under first line tritherapy and in those without treatment.

We showed that compared to AmpliCor DNA technic, the NucliSENS RNA technic had sensitivity and a specificity of 100%. Thus, this platform constitutes a good alternative for HIV EID. Through the diagnostic, the children can start antiretroviral (ARV) tritherapy or not. This tritherapy is difficult to achieve and its efficacy is sometimes hampered by resistance emergence. In our first resistance study, we showed that 56% of children were in ARV first line virological failure. Among them, resistance prevalence was 92%. Mutations conferring resistance to nucleoside and non nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) were found in 88% and 99% respectively. A second study resistance was conducted in newborns having not yet received ARV tritherapy. Thirteen among them were infected despite of nevirapine based prophylaxis for prevention of mother to child transmission. The results of RT genotyping showed 32% of resistance. Mutations conferring resistance to NNRTI were found in all the children having resistant viruses. Pediatric HIV infection remains a major concern, therefore the need to reinforce the virological monitoring to better take care of these pediatric patients.

**Mots clés : VIH, Enfant, Diagnostic Néonatal, Echec Virologique, Résistance aux ARV.**

---

**Discipline :** Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement

